

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2023.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Caroline Anselmi de Oliveira

Potencial bioativo de *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona contendo hidróxido de cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Caroline Anselmi de Oliveira

Potencial bioativo de *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona contendo hidróxido de cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria

Orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

Araraquara

2021

O48p

Oliveira, Caroline Anselmi de

Potencial bioativo de scaffolds de nanofibras de policaprolactona contendo hidróxido de cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas / Caroline Anselmi de Oliveira. -- Araraquara, 2021

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Josimeri Hebling

1. Polpa dentária. 2. Nanofibras. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Fibronectinas. 5. Expressão gênica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Caroline Anselmi de Oliveira

Potencial bioativo de *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona contendo hidróxido de cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientador: **Profa. Dra. Josimeri Hebling**

2º Examinador: **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**

*Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp)
Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora*

3º Examinador: **Profa. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos**

*Faculdade de Odontologia de Bauru (USP)
Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários*

Araraquara, 8 de março de 2021.

DADOS CURRICULARES

Caroline Anselmi de Oliveira

NASCIMENTO	12/02/1995 – Jundiaí – SP
FILIAÇÃO	Andréa Anselmi de Oliveira e Aparecido Luís de Oliveira
2014/2018	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP.
2019/2021	Pós-Graduação <i>stricto sensu</i> – Mestrado pelo programa de Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/UNESP.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Luís e Andréa, minha base e porto seguro, agradeço a oportunidade de seguir uma vida acadêmica, por terem me dado todo o suporte, financeiro, emocional e psicológico. A pessoa que eu sou hoje só existe por eles. Minha maior alegria é saber que não importa o que aconteça eu sempre terei esses sorrisos e colo para voltar. Obrigada por entenderem a minha ausência nos últimos anos, para que essa etapa da minha vida fosse concluída. Amo vocês com toda a força que há em mim.

Ao meu irmão, Luís Guilherme, sempre ao meu lado me aconselhando e me mostrando o lado bom das coisas, que mesmo sendo um profissional de uma área tão distinta da minha consegue entender cada momento que eu passo com muita paciência e sabedoria de irmão mais velho. Acho que quanto mais velhos ficamos, menos nos vemos, mas mais próximos estamos. Obrigada por ser esse amigo para todos os momentos, meu amor por você é infinito.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Josimeri Hebling, por ser mais do que uma orientadora acadêmica, mas também por ter me ensinado muito sobre a vida nesses dois anos que tive o prazer de compartilhar minha caminhada com a senhora. Agradeço por ter aceitado me orientar no mestrado, mesmo sabendo que seria uma mudança de área de pesquisa e que seria necessário muito aprendizado da minha parte para realizar esse trabalho. Sempre soube que seria uma oportunidade única trabalhar com um nome tão importante na área acadêmica, mas acabei me deparando com uma experiência que significou muito mais do que isso, a maneira como a senhora ama o que faz transparece na forma como é capaz de lidar com as diversas situações e isso fez com que se tornasse uma grande inspiração para mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, por tantos ensinamentos diários dentro e fora do laboratório no qual eu realizei a parte experimental desse trabalho. Por ter aberto as portas do seu laboratório de pesquisa e por toda a confiança no meu trabalho sempre me dando oportunidades para o meu crescimento profissional. O senhor é um exemplo de ética em pesquisa e de docência, é um prazer poder trabalhar ao seu lado.

Ao meu melhor amigo e irmão, Igor Paulino Mendes Soares, que é a pessoa mais incrível que cruzou os meus caminhos, ter você ao meu lado me faz uma pessoa melhor a cada dia. A sete anos eu divido a vida com você, desde a turma de graduação, a vida acadêmica e profissional, a casa, os momentos de laser e todas as alegrias e desesperos. Todas as vezes que me perguntam como a gente se aguenta 24 horas por dia, eu penso se eu seria capaz de passar por tantas coisas sem ter você todos os dias. Muito obrigada por tudo.

À minha mentora de pós-graduação, Maria Luísa de Alencar e Silva Leite, que acabou se tornando uma grande amiga, por ter me ensinado tanto tecnicamente, praticamente pegando na minha mão para que eu soubesse realizar as metodologias necessárias para realização desse trabalho. Além de ter me ensinado valores mais importantes dentro desse mundo desde o primeiro dia que comecei o curso de mestrado, sempre com muita paciência, gentileza e sabedoria.

Ao meu grande amigo, Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro, um presente que a pós-graduação me deu e fez dos meus dias no laboratório muito mais leves e divertidos. Te conhecer nessa fase da minha vida me ensinou a como lidar com as dificuldades da vida com calma e bom humor.

Aos colegas de laboratório, Fernanda, Uxua, Isabela, Lays, Carla, Laís, Larissa, Taísa, Beatriz e Marlon. Agradeço aos que ainda me acompanham nessa jornada e aos que já não estão mais no laboratório por partilharem comigo o dia a dia, sempre me ajudando, tanto nas tarefas do laboratório quanto na vida pessoal sempre que precisei. Com vocês aprendi o valor do trabalho em grupo e o quão leve fica a vida quando temos com quem partilhar.

As alunas de iniciação científica, Lídia, Rafaella e Isabela, pessoas que no trabalho de bancada lado a lado, acabaram se tornando amigas. Foi um prazer trabalhar com vocês e conhecer cada uma, sempre aprendendo e ensinando ao mesmo tempo, obrigada por toda ajuda. Saibam que minhas portas estarão sempre abertas para o que vocês precisarem.

Aos meus colegas do programa de pós-graduação, Luciana, Aline, Rafael, Isabella, Bianca, Marina, Silas e Analú. Obrigada por compartilharem tantos ensinamentos durante as clínicas e disciplinas. Um agradecimento especial para minha colega de turma do mestrado, Karina Borges Salomão, quem dividiu comigo essa trajetória, foi um prazer poder me aproximar de você nos últimos dois anos, obrigada por estar sempre pronta para me ajudar e por todo o companheirismo.

Ao meu amigo pediatra, Vinicius Krieger Costa Nogueira, minha inspiração profissional com quem eu tenho a sorte de dividir a casa e a minha vida pessoal. Obrigada por ser exatamente do jeito que você é, nossas conversas me fizeram uma pessoa mais madura e me ensinou que em todos os momentos podemos aprender a nos tornarmos pessoas melhores.

A minha melhor amiga, Shayene Chyntia Andrade de Almeida, a pessoa que sabe de cada luta e cada alegria que vivi nesses dois últimos anos. Esteve presente em todos os momentos, me acompanhando nas qualificações, sempre apoiando meu

trabalho, me mostrando o que é uma amizade de verdade. Obrigada por caminhar ao meu lado.

Aos meus amigos de Araraquara e de todos os lugares que passei, Caroline, Bruna, Aline, Camila, Bárbara Reina, Bárbara Hansen, Luiz Henrique, Maria Carolina, sempre presentes, mesmo que virtualmente nas horas de desespero, nunca negaram uma palavra de conforto e nunca mediram esforços para me ver bem. Natália Behaker, Thayná, Carol Lury, Thaila e Kamila, dividindo teto e me dando abrigo tanto físico quanto em palavras todos os dias. Falcão, Alessandra, Ketly, Eduardo e Camila, minha segunda casa em Araraquara, pessoas que no final de semana me recarregavam as energias com boas risadas para me fazer continuar. Marcela, Bruna e Liara, que me acompanharam desde o ensino médio e que levarei para a vida, obrigada por toda a amizade que não muda, independente do tempo que passamos sem nos ver.

À República Oásis, meu lar em Araraquara, obrigada a todas as moradoras, ex-moradoras e agregadas, vocês me ensinaram muito, cada uma com seu jeito. Poder morar em uma república foi uma experiência única, quero que vocês saibam que o sentimento de lar que eu tenho pela nossa casa nunca irá acabar. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me apoiarem.

As minhas avós, Arlete e Thereza, por toda a sabedoria, que nunca mediram esforços para me transmitir. Obrigada por todo o carinho de vó que nunca me faltou. Agradeço também, em memória, aos meus avôs, Antônio e Aparecido, que tenho certeza de que torcem por mim independentemente de onde estejam hoje, sempre me guiando e me protegendo.

À minha família, todos os meus tios e primos, por sempre me apoiarem mesmo a distância e entendendo minhas ausências em datas comemorativas devido aos compromissos com a pós graduação, nunca negando me acolher.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP) representada pelo atual diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e a Vice-Diretora Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, que através de todos os seus professores, funcionários e

alunos, impulsionou meu crescimento pessoal e profissional durante o período da Graduação e Pós-Graduação.

Ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Morfologia e Clínica Infantil da FOAr-UNESP, representado pela coordenadora Profa. Dra. Josimeri Hebling, o qual tive a oportunidade de coordenar no último ano e me trouxe inúmeros aprendizados.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr/UNESP, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde realizei esta pesquisa.

Ao Departamento de Morfologia e Clínica Infantil FOAr/UNESP. Agradeço a todos os professores e funcionários, pela disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo e com a minha formação.

Agradecimento as Professores que participaram do exame geral de qualificação: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro e Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso. Muito obrigada por todas as contribuições feitas a esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, representado pela Coordenadora Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti e Vice-Coordenadora Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli, por toda eficiência na gerência do programa durante este período.

Aos professores das Disciplinas de Odontopediatria e Odontologia para pacientes portadores de necessidades especiais do Departamento de Morfologia e Clínica Infantil da FOAr/UNESP, que me aceitaram enquanto estagiária e especialmente as Profas. Dras. Fernanda Lourenção Brighenti e Elisa Maria Aparecida Giro por quem fui supervisionada durante as atividades clínicas e pude aprender. Obrigada pela oportunidade.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/11192-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

*Não te deixes destruir...
Ajuntando novas pedras
e construindo novos poemas.
Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.
Faz de tua vida mesquinha
um poema.
E viverás no coração dos jovens
e na memória das gerações que hão de vir.
Esta fonte é para uso de todos os sedentos.
Toma a tua parte.
Vem a estas páginas
e não entres seu uso
aos que têm sede.*

Aninha e suas pedras

Cora Coralina¹

1. Denófrío DF. Melhores Poemas de Cora Coralina. 2ª Ed. Global. 2004.

Oliveira CA. Potencial bioativo de scaffolds de nanofibras de policaprolactona contendo hidróxido de cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar *scaffolds* de nanofibras a base de policaprolactona (PCL) incorporados com hidróxido de cálcio (HC), e avaliar seu potencial tóxico e bioativo sobre células da polpa dental humana (HDPCs) quando associados à fibronectina (FN). Inicialmente, concentrações de HC (0,1%; 0,2% ou 0,4%) foram incorporadas a *scaffolds* de PCL confeccionados por *electrospinning*. *Scaffolds* sem HC serviram como controle. Os *scaffolds* foram caracterizados quanto à morfologia por MEV associada à análise por EDS (n=4). Também foram analisados quanto a solubilidade, alteração de pH do meio e liberação de cálcio (n=8). Então, HDPCs foram cultivadas sobre os *scaffolds* e avaliadas quanto a viabilidade (alamarBlue, n=8; ensaio de Live/Dead n=4) nos períodos de 1, 7 e 14 dias, e adesão e espalhamento (F-actina, n=4) em 1, 3 e 7 dias do cultivo celular. O aumento da concentração de HC ampliou o diâmetro das nanofibras sem interferir na porcentagem de espaços interfibrilares e aumentou a liberação de cálcio, mantendo a neutralidade do meio (pH 7,0-8,0). Em comparação ao grupo controle, aumento significativo de viabilidade celular foi observado apenas para o grupo contendo HC 0,4%, em todos os períodos. Portanto, na segunda fase, *scaffolds* contendo ou não 0,4% de HC foram adsorvidos com FN (20 µg/mL). HDPCs semeadas na superfície foram avaliadas quanto a viabilidade, adesão e espalhamento, migração (Trans-well; n=4), expressão gênica de marcadores de diferenciação odontogênica (RT-qPCR; n=6), atividade de fosfatase alcalina (ALP; n=8) e formação de nódulos de mineralização (Alizarin red; n=8). Os dados foram submetidos a ANOVA e pós testes de Tukey, Games-Howell ou Sidak ($\alpha=5\%$). Os resultados de Live/Dead e F-actina foram avaliados qualitativamente. A incorporação de HC e FN nos *scaffolds*, isolados ou em associação, aumentou a capacidade de migração celular, além de permitir um melhor espalhamento citoplasmático, intensificado quando houve associação. O mesmo foi visto para a viabilidade celular. A expressão de ALPL e DSPP não foi regulada pela presença de HC e/ou FN, assim como a atividade de ALP. Regulação negativa do gene COL1A1 foi observada em todos os grupos experimentais quando comparados ao controle, enquanto o gene DMP1 foi superexpresso na presença de HC. O HC favoreceu a formação de matriz mineralizada, a qual não foi influenciada pela presença de FN. Assim, foi possível concluir que a incorporação de 0,4% de HC a *scaffolds* de PCL proporcionou topografia de superfície e propriedades favoráveis à adesão, espalhamento, proliferação e expressão do fenótipo odontogênico por HDPCs. Entretanto, apenas viabilidade, espalhamento e migração celular foram intensificados na presença de FN.

Palavras-chave: Polpa dentária. Nanofibras. Hidróxido de cálcio. Fibronectinas. Expressão gênica.

Oliveira CA. Bioactive potential of calcium hydroxide-containing polycaprolactone nanofiber scaffolds loaded with fibronectin on human pulp cells [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to synthesize and characterize polycaprolactone-based nanofiber scaffolds (PCL) incorporated with calcium hydroxide (CH), as well as to evaluate their potential toxicity and bioactivity on human dental pulp cells (HDPCs) when loaded with fibronectin (FN). Initially, different concentrations of CH (0.1%; 0.2% or 0.4%) were incorporated in PCL scaffolds made using electrospinning. Scaffolds without CH served as control. The morphology and composition of the scaffolds were characterized using SEM/EDS (n=4). They were also tested for solubility, pH change of the medium and calcium release (n=8). Then, HDPCs were seeded on the surface of the scaffolds and evaluated regarding their viability (AlamarBlue, n=8; Live/Dead assay, n=4) in the time intervals of 1, 7 and 14 days, and adhesion and spreading (F-actin, n=4) in 1, 3 and 7 days from cell culture. The increase in CH concentration increased the diameter of the nanofibers without interfering with the percentage of interfibrillar spaces, and increased the release of calcium, maintaining the neutrality of the medium (pH 7.0-8.0). In comparison to the control group, a significant increase in cell viability was seen only for the group containing 0.4% CH, in all time intervals. Therefore, in the next experiment, scaffolds containing or not 0.4% CH were loaded with FN (20 µg/mL). HDPCs were seeded on the scaffolds and evaluated for viability, adhesion and spreading, migration (Trans-well; n=4), gene expression of odontogenic differentiation markers (RT-qPCR; n=6), alkaline phosphatase activity (ALP; n=8) and mineralization nodules (Alizarin red; n=8). Data were submitted to ANOVA and Tukey, Games-Howell or Sidak post-hoc tests ($\alpha=5\%$). The results of live/dead and f-actin were evaluated qualitatively. The incorporation of HC and FN into the scaffolds increased cellular migration and spread, both intensified when CH and FN were combined. The same was seen for the viability of HDPCs. ALPL and DSPP expression, and ALP activity were not affected by HC and FN. COL1A1 was downregulated in all groups compared to the control, while DMP1 was upregulated in the presence of CH. The CH increased the formation of mineralized matrix which was not influenced by FN. In conclusion, the incorporation of 0.4% CH enabled PCL scaffolds with surface topography and properties that enhanced the viability, spread, proliferation and expression of odontoblast phenotype by HDPCs. However, only viability, spread and migration were improved by FN. The PCL+0.4%CH formulation may be a useful strategy for use in dentin tissue engineering.

Keywords: Dental pulp. Nanofibers. Calcium. Fibronectins. Gene expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	PROPOSIÇÃO	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	Complexo Dentino-Pulpar	20
3.2	Tratamento da Polpa Exposta	21
3.3	Engenharia Tecidual	22
3.4	<i>Scaffolds</i> : Arquitetura e Composição	23
3.5	Moléculas de Sinalização	25
3.6	Lacuna e Problematização	27
4	MATERIAL E MÉTODO	28
4.1	Estudo 1 – Síntese e Caracterização de <i>Scaffolds</i> Experimentais de Nanofibras Associados à Hidróxido de Cálcio e Seu Efeito Sobre Células da Polpa Dental Humana (HDPCs)	28
4.1.1	Confecção dos <i>scaffolds</i> pela técnica de <i>electrospinning</i>	28
4.1.2	Caracterização morfológica dos <i>scaffolds</i>	30
4.1.3	Ensaio de degradação hidrolítica	30
4.1.4	Liberação de cálcio e alteração de pH do meio	31
4.1.5	Cultura celular primária	32
4.1.6	Avaliação biológica	33
4.1.6.1	Adesão e espalhamento celular	34
4.1.6.2	Viabilidade e proliferação celular	35
4.2	Estudo 2 – Potencial Bioativo de <i>Scaffolds</i> de Nanofibras Contendo Cálcio e Impregnados com Fibronectina	36
4.2.1	Preparação dos <i>scaffolds</i> de nanofibras impregnados com fibronectina	36

4.2.2	Avaliação biológica	37
4.2.2.1	Migração celular	37
4.2.2.2	Adesão e espalhamento celular	38
4.2.2.3	Viabilidade e proliferação celular	38
4.2.2.4	Expressão gênica de marcadores de diferenciação odontogênica	38
4.2.2.5	Atividade de fosfatase alcalina	39
4.2.2.6	Formação de nódulos de mineralização	40
4.3	Análise Estatística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Resultados do Estudo 1	42
5.2	Resultados do Estudo 2	52
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O complexo dentino-pulpar é composto por dois tecidos com características histológicas completamente distintas (dentina e polpa), porém intercomunicados por uma célula altamente diferenciada, os odontoblastos, o que permite sua atuação de forma integrada^{1,2}. Diante de agressões ao tecido pulpar com conseqüente morte dos odontoblastos, células mesenquimais indiferenciadas residentes neste tecido são recrutadas para a região da injúria, se diferenciam em células odontoblastóides, e iniciam sua atividade secretória, com a deposição de proteínas da matriz dentinária. Este processo ilustra o forte potencial regenerativo intrínseco do complexo dentino-pulpar^{3,4} e a homeostase e/ou bioestimulação desse processo é o principal objetivo do tratamento do tecido pulpar exposto^{5,6}.

Há quase 100 anos, o hidróxido de cálcio (HC), em suas diversas formas e formulações, tem sido utilizado como agente capeador direto em polpas expostas. A característica alcalina desse material induz uma necrose de coagulação na superfície do tecido, a qual parece ser importante para o mecanismo de reparação pulpar^{2,7}. Células mesenquimais indiferenciadas presentes na camada rica em células são então atraídas para a região de necrose e bioestimuladas a se diferenciarem, substituindo os odontoblastos primários mortos pela injúria. Essas células recém-diferenciadas, denominadas odontoblastóides, sintetizam e depositam a matriz dentinária, a qual é subsequentemente mineralizada, formando-se assim uma barreira que se interpõe entre o material capeador e a polpa subjacente^{2,7-9}.

O potencial reparador do hidróxido de cálcio tem sido explicado, pelo menos em parte, por sua capacidade de solubilizar proteínas não colagenosas e glicosaminoglicanas da dentina em virtude de sua alcalinidade^{10,11}. Entre essas proteínas, o fator de crescimento (TGF- β 1), por exemplo, exerce papel fundamental na modulação da resposta de células odontoblastóides¹⁰. Mecanismo semelhante ocorre para o agregado trióxido mineral (MTA)¹². Entretanto, sabe-se que a aplicação destes materiais sobre a polpa resulta em perda superficial de tecido devido a necrose de coagulação e inflamação, não condizendo com os preceitos de biocompatibilidade e bioatividade^{6,12}. Desta forma, o desenvolvimento de novos materiais para aplicação direta sobre o tecido pulpar, com mecanismo de ação que não envolva perda tecidual ainda é necessário¹³.

Os preceitos da engenharia tecidual estão baseados no processo de *cell-homing* e visam bioestimular o potencial regenerador tecidual intrínseco¹⁴. A tríade da

engenharia tecidual é representada por (1) uma estrutura de suporte (*scaffold*), (2) moléculas sinalizadoras e (3) população celular. Assim, *scaffolds* associados a moléculas sinalizadoras atuam como suporte temporário para a migração e diferenciação das células mesenquimais residentes na polpa dental¹⁵, as quais, após diferenciação em células com fenótipo odontoblástico, seriam responsáveis por secretar a matriz dentinária. Essa matriz é posteriormente mineralizada, selando a exposição pulpar^{7,16}.

As características estruturais dos *scaffolds* influenciam o processo de *cell homing*¹⁷. Tem sido demonstrado que a adesão, proliferação e diferenciação de fibroblastos da polpa dental humana são intensificadas quando biomateriais com topografia de nanofibras são utilizados em comparação aos com superfícies lisas¹⁸, uma vez que mimetizam melhor a nano-morfologia estrutural e funcional da matriz extracelular¹⁹. Vários polímeros naturais e sintéticos vêm sendo utilizados para a construção de *scaffolds*, como quitosana, ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA) e policaprolactona (PCL)²⁰⁻²². O PCL foi um dos primeiros polímeros sintetizados nos anos 1930²³ e tem sido amplamente aplicado na área de engenharia tecidual até os tempos atuais devido às suas vantagens como boa processabilidade, baixa solubilidade, baixo ponto de fusão, biocompatibilidade²⁴ e capacidade da incorporação de partículas e/ou carregamento com fármacos²⁵⁻²⁷.

Estudos prévios têm demonstrado que a adição de baixas concentrações de diferentes fases minerais à base de cálcio em *scaffolds* porosos induz a expressão do fenótipo osteoblástico-odontoblástico devido a semelhança química e estrutural com os tecidos mineralizados^{21,28-32}. Além de aumentar a similaridade com a matriz extracelular, a adição de uma fase mineral nestes *scaffolds* gera um gradiente de íons cálcio em baixas concentrações em um ambiente levemente alcalino (pH 7,6-8,0), o que induz a migração e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas^{33,34}.

Ainda, a inclusão de um agente de sinalização ao *scaffold* de nanofibras contendo baixas concentrações de cálcio poderia potencializar a migração de células indiferenciadas residentes no tecido pulpar para a área da injúria e aumentar o potencial de adesão, proliferação e diferenciação dessas células, culminando com a síntese de um novo tecido¹⁵. Dentre as diversas substâncias com potencial quimiotático, a fibronectina tem sido proposta por já participar dos processos de reparação e remodelação tecidual³⁵⁻³⁷. Esta glicoproteína de elevado peso molecular atua na adesão e espalhamento celular³⁸⁻⁴⁰, bem como, na indução da migração,

proliferação e diferenciação celular^{37,41,42}. Dentro do reparo do complexo dentino-pulpar, a fibronectina desempenha papel primordial na diferenciação odontoblástica. A fibronectina está presente logo abaixo da zona de calcificação distrófica formada após a aplicação de um material a base de hidróxido de cálcio sobre a ferida pulpar, mediando a migração de células mesenquimais indiferenciadas para esta região, bem como sua adesão e diferenciação odontoblástica³⁵.

A despeito dos bons resultados clínicos observados para o capeamento pulpar direto com materiais à base de hidróxido de cálcio e silicato de cálcio⁴³, esses materiais capeadores resultam em necrose superficial da polpa, morte celular e consequente perda tecidual⁴⁴. Portanto, ainda é necessário o desenvolvimento de materiais alternativos para aplicação direta sobre o tecido pulpar, os quais respeitem os preceitos de biocompatibilidade e bioatividade importantes para a regeneração tecidual.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias propostas, e dentro das limitações desse trabalho *in vitro*, concluiu-se que a incorporação de hidróxido de cálcio a *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona não inviabilizou a eletrofiação do polímero e proporcionou topografia de superfície e propriedades favoráveis à adesão, espalhamento e proliferação de HDPCs, intensificados para a concentração de 0,4%. A incorporação de 0,4% de hidróxido de cálcio foi capaz de estimular os eventos celulares de migração, adesão, proliferação, viabilidade e diferenciação, assim como a expressão do fenótipo odontogênico por HDPCs, independente da presença de fibronectina.

REFERÊNCIAS*

1. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1): 51-68.
2. Goldberg M, Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Six N, Septier D, Priam F, et al. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am.* 2006; 50(2): 277-98.
3. Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod.* 2014; 40 (Suppl 4): 2-5.
4. Hanna SN, Perez Alfayate R, Prichard J. Vital pulp therapy an insight over the available literature and future expectations. *Eur Endod J.* 2020; 5(1): 46-53.
5. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J.* 2013; 46(1): 3-19.
6. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
7. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology.* 2010; 98(1): 2-14.
8. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater.* 2006; 22(10): 954-62.
9. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 81(1): 175-84.
10. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006; 27(14): 2865-73.
11. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent.* 2007; 35(8): 636-42.
12. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J.* 2003; 36(3): 225-31.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res*. 2012; 91(3): 227-34.
14. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(2): 184-98.
15. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod*. 2014; 40 (Suppl 4): 41-5.
16. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012; 28(1): 23-40.
17. Jazayeri HE, Lee SM, Kuhn L, Fahimipour F, Tahriri M, Tayebi L. Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: a review. *Dent Mater*. 2020; 36(2): e47-58.
18. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, Bressiani AH. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013; 9(11): e116-23.
19. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*. 2006; 7(10): 2796-805.
20. Farhadian N, Godiny M, Moradi S, Hemati Azandaryani A, Shahlaei M. Chitosan/gelatin as a new nano-carrier system for calcium hydroxide delivery in endodontic applications: Development, characterization and process optimization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018; 92: 540-6.
21. Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, Basso FG, Huck C, Hebling J, de Souza Costa CA. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(9): 2827-39.
22. Stefani I, Cooper-White JJ. Development of an in-process UV-crosslinked, electrospun PCL/aPLA-co-TMC composite polymer for tubular tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2016; 36: 231-40.
23. Van Natta, FJ, Hill, JW, Carothers, WH. Studies of polymerization and ring formation. XXIII. ϵ -caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc*. 1934; 56(2): 455-7.
24. Leite ML, Usberti FR, Ortecho-Zuta U, Bordini EAF, Soares DG, Hebling J, et al. Synthesis and characterization of nanofibers scaffolds and their biological effects on human pulp cells. *Rodyb*. 2019; 9(1): 9-15.
25. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010; 35(10): 1217-56.

26. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, Mehrotra D. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: review of literature. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020; 10(1): 381-8.
27. Thuaksuban N, Pannak R, Boonyaphiphat P, Monmaturapoj N. In vivo biocompatibility and degradation of novel Polycaprolactone-Biphasic Calcium phosphate scaffolds used as a bone substitute. *Biomed Mater Eng.* 2018; 29(2): 253-67.
28. Xu HH, Zhao L, Weir MD. Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering. *J Dent Res.* 2010; 89(12): 1482-8.
29. Liu H, Peng H, Wu Y, Zhang C, Cai Y, Xu G, et al. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials.* 2013; 34(18): 4404-17.
30. Wang P, Zhao L, Chen W, Liu X, Weir MD, Xu HH. Stem cells and calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration. *J Dent Res.* 2014; 93(7): 618-25.
31. Roy P, Sailaja RR. Chitosan-nanohydroxyapatite composites: mechanical, thermal and bio-compatibility studies. *Int J Biol Macromol.* 2015; 73: 170-81.
32. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, Costa CA. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): e54.
33. Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2006; 32(3): 198-201.
34. Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 394(4): 1093-7.
35. Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1996; 75(8): 1590-7.
36. Lawson CD, Burridge K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases.* 2014; 5: e27958.
37. Battista MC, Otis M, Côté M, Laforest A, Peter M, Lalli E, Gallo-Payet N. Extracellular matrix and hormones modulate DAX-1 localization in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(9): 5426-31.
38. Costa-Silva B, da Costa MC, Melo FR, Neves CM, Alvarez-Silva M, Calloni GW, et al. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. *Exp Cell Res.* 2009; 315(6): 955-67.

39. Karakeçili A, Messina GM, Yurtsever MÇ, Gümüşderelioğlu M, Marletta G. Impact of selective fibronectin nanoconfinement on human dental pulp stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 123: 39-48.
40. Jones TD, Kefi A, Sun S, Cho M, Alapati SB. An optimized injectable hydrogel scaffold supports human dental pulp stem cell viability and spreading. *Adv Med*. 2016; 2016: 7363579.
41. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod*. 2010; 36(12): 1963-6.
42. Chatakun P, Núñez-Toldrà R, Díaz López EJ, Gil-Recio C, Martínez-Sarrà E, Hernández-Alfaro F, et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(1): 113-42.
43. Suhag K, Duhan J, Tewari S, Sangwan P. Success of direct pulp capping using mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide in mature permanent molars with pulps exposed during carious tissue removal: 1-year follow-up. *J Endod*. 2019; 45(7): 840-7.
44. de Souza Costa CA, Duarte PT, de Souza PP, Giro EM, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent*. 2008; 21(4): 255-61.
45. Tronstad L, Mjör IA. Pulp reactions to calcium hydroxide-containing materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972; 33(6): 961-9.
46. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7(2): 104-33.
47. Modena KCS, Casas-Apayco LC, Atta MT, de Souza Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(6): 544-54.
48. Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Histological observations of hard tissue barrier formation in amputated dental pulp capped with alpha-tricalcium phosphate containing calcium hydroxide. *Endod Dent Traumatol*. 1994; 10(3): 113-20.
49. Hanna SN, Perez Alfayate R, Prichard J. Vital pulp therapy an insight over the available literature and future expectations. *Eur Endod J*. 2020; 5(1): 46-53.
50. George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem*. 1993; 268(17): 12624-30.
51. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006; 39(5): 415-22.
52. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001; 7(6): 679-89.

53. Ekblom P, Vestweber D, Kemler R. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu Rev Cell Biol.* 1986; (2): 27-47.
54. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials.* 1999; 20(6): 573-88.
55. Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 2011; 32(31): 7822-30.
56. Soares DG, Bordini EAF, Cassiano FB, Bronze-Uhle ES, Pacheco LE, Zabeo G, et al. Characterization of novel calcium hydroxide-mediated highly porous chitosan-calcium scaffolds for potential application in dentin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020; 108(6): 2546-59.
57. Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Eng.* 2006; 12(3): 435-47.
58. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(14): 1392–412.
59. Kostopoulos V, Kotrotsos A, Fouriki K, Kalarakis A, Portan D. Fabrication and characterization of polyetherimide electrospun scaffolds modified with graphene nano-platelets and hydroxyapatite nano-particles. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(2): 583.
60. Liu X, Won Y, Ma PX. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly (L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(21): 3980-7.
61. Yeo A, Rai B, Sju E, Cheong JJ, Teoh SH. The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 84(1): 208-18.
62. Tiwari AP, Joshi MK, Kim JI, Unnithan AR, Lee J, Park CH, Kim CS. Bimodal fibrous structures for tissue engineering: Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility. *J Colloid Interface Sci.* 2016; 476: 29-34.
63. Jaklenec A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombor DM, Aaron R, Mathiowitz E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials.* 2008; 29(10): 1518-25.
64. Asghari Sana F, Çapkın Yurtsever M, Kaynak Bayrak G, Tunçay EÖ, Kiremitçi AS, Gümüşderelioğlu M. Spreading, proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells on chitosan scaffolds immobilized with RGD or fibronectin. *Cytotechnology.* 2017; 69(4): 617-30.
65. Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67(2): 531-7.

66. Leite ML, Soares DG, Anovazzi G, Mendes Soares IP, Hebling J, de Souza Costa CA. Development of fibronectin-loaded nanofiber scaffolds for guided pulp tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020; 31: e34785.
67. Kim JJ, Bae WJ, Kim JM, Kim JJ, Lee EJ, Kim HW, et al. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J Biomater Appl*. 2014; 28(7): 1069-78.
68. Johannsen, K, Rademacher, S. Modelling the kinetics of calcium hydroxide dissolution in water. *Acta Hydrochim Hydrobiol*. 1999; 27: 72-8.
69. Natale LC, Rodrigues MC, Xavier TA, Simões A, de Souza DN, Braga RR. Ion release and mechanical properties of calcium silicate and calcium hydroxide materials used for pulp capping. *Int Endod J*. 2015; 48(1): 89-94.
70. Apáti Á, Berecz T, Sarkadi B. Calcium signaling in human pluripotent stem cells. *Cell Calcium*. 2016; 59(2-3): 117-23.
71. Grover C, Shetty N. Evaluation of calcium ion release and change in pH on combining calcium hydroxide with different vehicles. *Contemp Clin Dent*. 2014; 5(4): 434-9.
72. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Gotoh M, et al. Effects of extracellular ph on dental pulp cells in vitro. *J Endod*. 2016; 42(5): 735-41.
73. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(3): 789-95.
74. Jung GY, Park YJ, Han JS. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(5): 1649-54.
75. Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J*. 2008; 41(11): 933-8.
76. Grigoriou E, Cantini M, Dalby MJ, Petersen A, Salmeron-Sanchez M. Cell migration on material-driven fibronectin microenvironments. *Biomater Sci*. 2007; 5(7): 1326-33.
77. Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011; 698: 107-21.
78. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*. 1999; 25(10): 676-82.
79. Narita H, Itoh S, Imazato S, Yoshitake F, Ebisu S. An explanation of the mineralization mechanism in osteoblasts induced by calcium hydroxide. *Acta Biomater*. 2010; 6(2): 586-90.

80. Sciaky I, Pisanti S. Localization of calcium placed over amputated pulps in dogs' teeth. *J Dent Res.* 1960; 39: 1128-32.
81. Kanaya S, Xiao B, Sakisaka Y, Suto M, Maruyama K, Saito M, et al. Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: 20170231.
82. Kim JJ, Bae WJ, Kim JM, Kim JJ, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J Biomater Appl.* 2014; 28(7): 1069-78.
83. Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, Petit M, Pilet P, Rouillon T, et al. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone.* 2011; 48(4): 894-902
84. Rosenberg MD. Long-range interactions between cell and substratum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962; 48(8): 1342-9.
85. Wang X, Jong G, Lin LM, Shimizu E. EphB-EphrinB interaction controls odontogenic/osteogenic differentiation with calcium hydroxide. *J Endod.* 2013; 39(10): 1256-60
86. Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Sundelin J, Lind P, Peterson PA. The cell attachment domain of fibronectin. Determination of the primary structure. *J Biol Chem.* 1982; 257(16): 9593-7.
87. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. The role of integrin beta 1 in human dental pulp cell adhesion on laminin and fibronectin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(3): 314-8.
88. Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol.* 2005; 242: 121-56.
89. Martinez EF, Silva LAH, Furuse C, Araújo NS, Araújo VC. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. *Braz Dent J.* 2009; 20(5): 365-9.
90. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* 1993; 119(4): 1079-91.