

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/06/2023.



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



Maria Luísa de Alencar e Silva Leite

**Síntese e avaliação de biomateriais associados a proteínas da matriz
extracelular para a regeneração do tecido pulpar**

Araraquara

2021



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



Maria Luísa de Alencar e Silva Leite

Síntese e avaliação de biomateriais associados a proteínas da matriz extracelular para a regeneração do tecido pulpar

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral na Área de Prótese

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Coorientadora: Prof. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos

Araraquara

2021

L533s

Leite, Maria Luísa de Alencar e Silva

Síntese e avaliação de biomateriais associados a proteínas da matriz extracelular para a regeneração do tecido pulpar / Maria Luísa de Alencar e Silva Leite. -- Araraquara, 2021

104 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

Coorientadora: Diana Gabriela Soares dos Passos

1. Proteínas da matriz extracelular. 2. Nanofibras. 3. Hidrogéis. 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.

Maria Luísa de Alencar e Silva Leite

Síntese e avaliação de biomateriais associados a proteínas da matriz extracelular para a regeneração do tecido pulpar

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**

2º Examinador: **Prof. Dr. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**

*Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp)
Departamento de Odontologia Restauradora*

3º Examinador: **Prof. Dr. Cristiane Duque**

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

4º Examinador: **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**

*Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese*

5º Examinador: **Prof. Dr. Gisele Faria**

*Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp)
Departamento de Odontologia Restauradora*

Araraquara, 30 de Junho de 2021.

DADOS CURRICULARES

Maria Luísa de Alencar e Silva Leite

NASCIMENTO: 24/12/1991 – João Pessoa – PB

FILIAÇÃO: Antônio Wellington de Alencar Leite
Carmen Lúcia de Lucena e Silva Leite

- 2010-2015 Graduação em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba. Bolsa PIBIC (2011-2015).
- 2015-2017 Mestrado em Reabilitação Oral, área de Prótese, pela Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Bolsa CNPq #131183/2015-0; Bolsa FAPESP #2015/15635-7.
- 2017-Atual Doutorado em andamento em Reabilitação Oral, área de Prótese, pela Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Bolsa FAPESP #2017/14210-8.
- 2019-2019 Participação do Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior - PAADES, grupo A (Atividades de Docência), na disciplina Materiais Odontológicos I do curso de graduação em Odontologia, do Campus de Araraquara, no período de 18/02/2019 a 02/12/2019 (CH = 120 h).
- 2020-2021 Doutorado Sanduíche para desenvolvimento de atividade em pesquisa e internacionalização, pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá. Bolsa FAPESP #2019/14965-4.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos	22
Artigos aceitos para publicação	02
Capítulos de livros publicados	05
Trabalhos publicados em anais de eventos	79
Apresentações de trabalhos	103

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado	14
---	----

Eventos

Participações em evento	44
Organização de evento	7

Outras informações relevantes

Aprovação em 1º lugar no Exame de Seleção do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, curso de MESTRADO, da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP.

Aprovação em 1º lugar no Exame de Seleção do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, curso de DOUTORADO, da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP.

Dedico este trabalho inteiramente a Deus, que em todos os momentos esteve olhando por mim e me dando forças para seguir e perseverar continuamente. E de modo especial, agradeço a Ele por tornar essa caminhada mais fácil e prazerosa, colocando pessoas maravilhosas ao meu redor.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por confiar e abrir as portas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais desde o período da minha graduação, aceitando me orientar como aluna de Mestrado e Doutorado. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, por estar presente e me guiar nessa longa jornada de crescimento pessoal e profissional. Agradeço de coração pelo imenso cuidado que tem por cada uma de nós, seus orientados.

À minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Diana Gabriela Soares dos Passos**, por todos os ensinamentos transmitidos, por permitir meu amadurecimento científico e por direcionar minha jornada acadêmica ao longo desses anos.

À **Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling**, pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento do meu projeto de Doutorado, mostrando-se sempre muito solícita e atenciosa durante todas as etapas de execução da pesquisa. Muito obrigada, professora!

Aos meus pais, **Antônio Wellington e Carmen Lúcia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas a mim e a meus irmãos, abrindo mão do que fosse preciso para permitir nosso crescimento profissional. Obrigada por serem meus melhores exemplos como seres-humanos, por me mostrar que a vida, em todos os seus aspectos, requer muita dedicação, perseverança, humildade, amor e sem dúvida, Deus no centro de todas as coisas. Todas as etapas vencidas também são méritos vossos, meus pais! Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Pedro Henrique e Ana Cecília**, pelo cuidado, amor e apoio constante a mim! Obrigada por serem meus melhores amigos! Amo vocês!

Aos **amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB – FOAr/UNESP)**, por todos os momentos partilhados diariamente, pelas conversas ou mesmo pela ajuda em algum momento no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela harmoniosa convivência e pelo aprendizado mútuo neste período.

Aos **colegas de Doutorado em Reabilitação Oral**, da FOAr-UNESP, por tornarem esse curso de Doutorado mais leve e prazeroso diante de uma turma tão boa quanto a nossa. Obrigada pelo apoio e torcida em cada etapa!

Aos **familiares e amigos**, pela torcida e orações prestadas a mim. Obrigada por fazerem parte da minha vida e todos os momentos compartilhados durante todos esses anos de vida!

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP)**, representada pela atual Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e a Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, que através de todos os seus professores, funcionários e alunos, foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal no período de Pós-Graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**, representado pela Coordenadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina e a Vice-Coordenadora Prof^a. Dr^a. Daniela Aparecida Godoi Gonçalves, por toda acessibilidade durante este período.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia** e ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr-UNESP**. A todos os professores e funcionários, agradeço a disponibilidade, presteza e respeito que sempre tiveram comigo. Em especial, agradeço aos professores por abrirem as portas das disciplinas para realização de estágio docência ao longo da Pós-Graduação em Reabilitação Oral, os quais foram fundamentais para meu desenvolvimento.

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 a maior parte desta pesquisa foi realizada.

Ao **Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Infantil da FOAr-UNESP**, representado pela coordenadora Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, o qual forneceu suporte para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Laboratório Geral de Fisiologia**, do Departamento de Fisiologia e Patologia, representado pelos docentes Prof. Dr. José Vanderlei Menani, Prof^a. Dr^a. Débora Simões de Almeida Colombari e Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria de Paula, por concederem a utilização de equipamentos deste espaço de fundamental importância para execução desta pesquisa.

À **Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Fisiologia e Patologia, da FOAr-UNESP**, representado pelo **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelos inúmeros ensinamentos que recebi ao realizar estágio docência junto à equipe. Esta experiência permitiu não somente colaborar nas práticas em laboratório, mas também ministrar aulas teóricas para a graduação, fortalecendo minha experiência docente.

À **Disciplina de Materiais Odontológicos I**, representada pela **Prof. Renata Garcia Fonseca**, por ter me recebido para realização de Estágio Docência e posterior participação do Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior - PAADES, grupo A (Atividades de Docência). A experiência docente adquirida foi enriquecedora para minha formação e sem dúvida esta foi alcançada pelo apoio constante de todos os professores e técnicos que fazem parte desta disciplina pela qual tenho um imenso carinho.

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 Processo nº 2017/14210-8) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Leite MLAS. Síntese e avaliação de biomateriais associados a proteínas da matriz extracelular para a regeneração do tecido pulpar [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

A regeneração tecidual guiada tem sido considerada uma estratégia promissora para substituir terapias endodônticas convencionais em casos de dentes com rizogênese incompleta. Portanto, no presente estudo, proteínas da matriz extracelular (fibronectina, laminina e colágeno tipo I) foram avaliadas a fim de selecionar um potente agente de sinalização sobre células da papila apical humana (hAPCs). Em seguida, com o objetivo de desenvolver biomateriais inovadores para regeneração pulpar de dentes com rizogênese incompleta, um scaffold tubular de nanofibras e um hidrogel de preenchimento foram sintetizados e associados à proteína da matriz extracelular com maior potencial bioativo. Assim, foi possível avaliar a influência dos biomateriais sobre a migração, adesão, proliferação e síntese de colágeno pelas hAPCs. No Artigo 1, diferentes concentrações (1, 5 e 10 µg/mL) de fibronectina (FN), laminina (LM) e colágeno tipo I (COL) foram aplicadas no fundo de compartimentos não tratados de placas de 96 compartimentos esterilizadas. Como controles negativo (CN) e positivo (CP), compartimentos não tratados e pré-tratados, respectivamente, foram usados. Após semear as hAPCs nos diferentes substratos, os seguintes parâmetros de bioatividade foram avaliados: adesão, viabilidade, espalhamento, síntese de colágeno total/colágeno tipo I e expressão gênica (ITGA5, ITGAV, COL1A1, COL3A1). Maior potencial de adesão foi observado para todas as concentrações de FN, sendo o efeito dose-dependente. Os melhores resultados de viabilidade e espalhamento celular, bem como síntese de colágeno ocorreram quando 5 e 10 µg/mL de FN foi utilizado. FN na concentração de 10 µg/mL aumentou a expressão de ITGA5, ITGAV e COL1A1 em comparação ao CP. Embora maiores valores de bioatividade tenham sido demonstrados pela LM (5 e 10 µg/mL) em comparação ao CN, essas concentrações de LM exibiram menores efeitos bioativos em relação ao CP. As concentrações de COL avaliadas não mostraram bioatividade sobre as células em cultura. Portanto, concluiu-se que FN nas concentrações de 5 e 10 µg/mL exerceu efeitos bioativos mais intensos sobre as hAPCs. Então, no Artigo 2, a técnica de electrospinning foi empregada para obter, por meio do uso de poli-caprolactona (PCL), scaffolds de nanofibras aleatórias (NR) e alinhadas (NA), os quais tiveram suas propriedades biológicas avaliadas. As melhores formulações de NR e NA foram associadas a 0, 5 ou 10 µg/mL de FN sendo a bioatividade determinada. Finalmente, scaffolds tubulares de NR e NA revestidos com FN foram desenvolvidos e seu potencial quimiotático foi analisado usando um modelo in vitro para simular a regeneração pulpar de dentes com rizogênese incompleta. Foi demonstrado que todos os scaffolds testados são citocompatíveis. No entanto, NR e NA à base de 10% de PCL promoveram maior proliferação, adesão e espalhamento de hAPCs. Células poligonais e alongadas

foram observadas em NR e NA, respectivamente. Quanto maior a concentração de FN nos scaffolds, maior a migração, viabilidade, proliferação, adesão e espalhamento celular, bem como a síntese de colágeno e expressão gênica (ITGA5, ITGAV, COL1A1, COL3A1). Além disso, os scaffolds tubulares de NA associados com FN (10 µg/mL) mostraram maior potencial quimiotático sobre as APCs. Então, concluiu-se que os scaffolds tubulares de NA revestidos com FN são biomateriais promissores, os quais talvez possam ser usados, no futuro, para promover regeneração pulpar mediada por hAPCs em casos de dentes com rizogênese incompleta. No Artigo 3, hidrogéis com variada proporção de colágeno e gelatina (Col/Gel; v/v) foram inicialmente preparados e avaliados de acordo com os seguintes grupos: Colágeno (controle positivo); Col/Gel 4:6; Col/Gel 6:4; Col/Gel 8:2. A viabilidade, adesão/espalhamento das hAPCs semeadas nos hidrogéis foi determinada. Diferentes concentrações de FN (0, 5 ou 10 µg / mL) foram incorporadas à melhor formulação do hidrogel de colágeno/gelatina selecionada. Em seguida, as hAPCs semeadas nos biomateriais foram analisadas quanto a migração, viabilidade, adesão/espalhamento e expressão gênica de ITGA5, ITGAV, COL1A1 e COL3A1. As células do grupo Col/Gel 8:2 exibiram a maior viabilidade e adesão/espalhamento, semelhante ao observado no grupo controle. Ainda, as hDPCs exibiram maior migração, viabilidade, adesão/espalhamento e expressão gênica de marcadores envolvidos na regeneração pulpar quanto maior a concentração de FN incorporada ao hidrogel de colágeno/gelatina. Assim, concluiu-se que um hidrogel de colágeno/gelatina com 10 µg/mL de FN apresentou potente efeito bioativo e quimiotático sobre hAPCs em cultura.

Palavras – chave: Proteínas da matriz extracelular. Nanofibras. Hidrogéis.

Leite MLAS. Synthesis and evaluation of biomaterials associated with extracellular matrix proteins for pulp tissue regeneration [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Guided tissue regeneration has been considered a promising strategy to replace conventional endodontic therapy of teeth with incomplete root formation. Therefore, in the present study extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin and type I collagen) were assessed to select a potent signaling agent on human apical papilla cells (hAPCs). Next, to develop interesting biomaterials for pulp regeneration of teeth with incomplete root formation, a tubular nanofiber scaffold and a filling hydrogel were synthesized and associated with the most bioactive extracellular matrix protein previously selected. The biomaterials were evaluated concerning their influence on migration, adhesion, proliferation and collagen synthesis by hAPCs. Then, in Paper 1, different concentrations (1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$) of fibronectin (FN), laminin (LM), and type I collagen (COL) were applied to the bottom of non-treated wells of sterilized 96-well plates. As negative (NC) and positive (PC) controls, non-treated and pre-treated wells, respectively, were used. After seeding the hAPCs on the different substrates, the following bioactivity parameters were assessed: adhesion, viability, spreading, total collagen/type I collagen synthesis and gene expression of ITGA5, ITGAV, COL1A1, and COL3A1. The greatest cells attachment occurred for all concentrations of FN, and in a dose-dependent way. The highest cell viability, spreading and collagen synthesis was observed when 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ of FN were used. FN at 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration increased the ITGA5, ITGAV, and COL1A1 expression in comparison with PC. Although the higher bioactivity values shown by LM at 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ in comparison with NC, those concentrations of LM exhibited lower bioactive effects than PC. All concentrations of COL showed no bioactivity on cultured cells. Therefore, it was concluded that 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ FN exerted the most intense bioactive effects on hAPCs. In Paper 2, random (NR) and aligned (NA) nanofiber scaffolds of poly-caprolactone (PCL) were obtained by electrospinning technique and their biological properties assessed. The best formulations of NR and NA were loaded with 0, 5 or 10 $\mu\text{g/mL}$ of FN and their bioactivity evaluated. Finally, FN-loaded NR and NA tubular scaffolds were prepared, and their chemotactic potential was analyzed using an in vitro model to mimic the pulp regeneration of teeth with incomplete root formation. All scaffolds tested were cytocompatible. However, hDPCs seeded on 10% PCL-based NR and NA scaffolds presented the highest proliferation, adhesion and spreading. Polygonal and elongated cells were observed on NR and NA scaffolds, respectively. The higher the concentration of FN added to the scaffolds, greater the migration, viability, proliferation, adhesion/spreading, as well as collagen synthesis and gene expression (ITGA5, ITGAV, COL1A1, COL3A1) by hDPCs. In addition, tubular scaffolds with NA loaded with FN (10 $\mu\text{g/mL}$) showed the highest chemotactic potential on hAPCs. Then, it was concluded that FN-loaded NA scaffold

is an interesting biomaterial that may be used in a near future to promote hAPCs-mediated pulp regeneration of endodontically compromised teeth with incomplete root formation. In Paper 3, diverse concentrations of collagen and gelatin (Col/Gel; v/v) were used to prepare hydrogels, which were assessed according to the established groups: Collagen (positive control); Col/Gel 4:6; Col/Gel 6:4; Col/Gel 8:2. The viability, adhesion and spreading of cells seeded on the hydrogels were evaluated. Concentrations of 0, 5 or 10 $\mu\text{g/mL}$ FN were incorporated into the best formulation of the collagen/gelatin hydrogel selected. Then, the hAPCs seeded on the biomaterials were assessed concerning their migration, viability, adhesion/spreading, and gene expression of ITGA5, ITGAV, COL1A1 and COL3A1. In Col/Gel 8:2 group, cells exhibited greater viability, adhesion and spreading in comparison with control. Higher values of hAPCs migration, viability, adhesion/spreading and gene expression of pulp regeneration markers were found, the higher the concentration was of FN incorporated into the collagen/gelatin hydrogel. Thus, one can conclude that the collagen/gelatin hydrogel with 10 $\mu\text{g/mL}$ of FN had potent bioactive and chemiotactic effects on cultured hAPCs.

Keywords: Extracellular matrix proteins. Nanofibers. Hydrogels.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 PUBLICAÇÕES	16
3.1 Publicação 1	16
3.2 Publicação 2	40
3.2 Publicação 3	77
4 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

Uma vez rompida a integridade do esmalte/dentina, o complexo dentina-polpa passa a ser exposto à diversas injúrias do meio bucal, que compreendem desde estímulos de origem microbiana, traumática e iatrogênica, até mesmo danos de origem química advindos de materiais dentários e seus componentes¹. Quando a agressão é de grande intensidade, culminando em pulpite irreversível ou mesmo necrose pulpar, a manutenção do tecido infectado torna-se inviável. Assim, em dentes com rizogênese incompleta tem sido indicado a realização de tratamento endodôntico com intenção de promover a apicificação do dente comprometido. Por meio desse método, todo tecido pulpar é removido através do preparo químico-mecânico, seguido de preenchido do canal radicular com medicação intracanal. Esta medicação deve apresentar potencial de estimular o selamento biológico do ápice radicular por meio da formação de um tecido mineralizado². Dessa forma, a continuidade da formação do ápice (apicigênese) é interrompida, impedindo que o canal radicular exiba morfologia normal e que a raiz apresente comprimento regular após a completa erupção do dente^{3,4}. Raízes curtas podem comprometer a estabilidade do elemento dental e a resistência das paredes do canal radicular para suportar os esforços mastigatórios^{5,6}.

Diante desta problemática, os conceitos da engenharia tecidual têm sido cada vez mais aplicados com o objetivo de manter a vitalidade dos dentes ou estimular o reparo/regeneração de tecidos dentários danificados^{3,7-11}. Este campo da ciência se fundamenta em três princípios básicos: 1) no uso de biomateriais que atuem como arcabouço temporário para a adesão, proliferação e diferenciação celular; 2) no estímulo de células a sintetizar e depositar um novo tecido similar ao de origem; e 3)

no emprego de agentes de sinalização com potencial para induzir a migração celular e potencializar a ação do biomaterial^{12,13}. Assim, a substituição da terapia mecânica associada a aplicação de materiais cáusticos, a qual tem sido usada por décadas para induzir a apicificação, por estratégias que estimulem a regeneração tecidual, apresenta-se com uma alternativa viável e promissora. Tem sido demonstrado que técnicas biológicas usadas para tratar dentes com rizogênese incompleta podem recuperar as propriedades e características de um dente vital e assegurar a continuidade da formação radicular^{3,9}. Para que este evento ocorra, o biomaterial (scaffold) a ser usado no procedimento deve exibir arquitetura similar àquela do microambiente in vivo, além de ter potencial bioativo capaz de acelerar o processo de regeneração tecidual^{14,15}.

Considerando as técnicas dentro do campo da engenharia tecidual direcionada a regeneração de tecidos lesados, duas estratégias biológicas surgiram como as abordagens mais promissoras: cell approach e cell-free approach¹⁶⁻¹⁹. A primeira, envolve a implantação de um biomaterial contendo células pré-cultivadas, na área do tecido danificado que se busca regenerar. Dentro deste contexto, além de apresentar estrutura porosa tri-dimensional e propriedades biológicas que permitam a acomodação das células, o biomaterial selecionado deve atuar como matriz extracelular temporária e regular o crescimento celular in vivo. A segunda estratégia (cell-free approach), envolve a utilização de biomateriais associados a potentes agentes de sinalização. Ao serem posicionados junto ao tecido previamente danificado, os biomateriais selecionados devem promover a liberação controlada dos agentes sinalizadores de tal maneira que esses consigam estimular a migração de células residentes em direção ao sítio de interesse, bem como promover a proliferação e diferenciação destas células, favorecendo a formação de

um novo tecido¹⁶⁻¹⁹. Esta modalidade de terapia parece ser a mais interessante para ser aplicada em casos de dentes com rizogênese incompleta. Isto porque num estudo histopatológico realizado em dentes de ratos com lesão periapical induzida, foi demonstrado que a papila apical se manteve viável mesmo após 90 dias de ter ocorrido a necrose pulpar²⁰. Sabe-se que a papila apical é uma rica fonte de células tronco¹⁶. Assim, biomateriais associados a potentes agentes de sinalização poderiam ser introduzidos nos canais radiculares para induzir a migração de células presentes na papila apical, bem promover a adesão, proliferação e diferenciação dessas células ao longo de toda a extensão do canal, permitindo a síntese de um novo tecido no local³.

Diante dessa perspectiva, Bottino et al.²¹ demonstraram que o processo de adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais é intensificado quando scaffolds com topografia de nanofibras são empregados em comparação com superfícies lisas. Os autores relataram que scaffolds de nanofibras podem ser obtidos pela técnica de electrospinning, a qual permite produção de um biomaterial que mimetiza a nano-morfologia estrutural e funcional da matriz extracelular. Por meio dessa técnica de electrospinning, nanofibras interconectadas com diâmetros variados e elevada área de superfície podem ser produzidas para favorecer a adesão celular, bem como a síntese de novo tecido semelhante ao de origem¹². Essa técnica também permite obter nanofibras com disposição aleatória ou paralela, o que pode influenciar o potencial de migração e metabolismo celular²²⁻²⁴. Baseado nesses dados científicos prévios, foi possível estabelecer a hipótese de que a disposição paralela das nanofibras no biomaterial poderia favorecer e guiar a migração das células da papila apical para o interior do canal radicular, favorecendo a regeneração tecidual.

Por outro lado, diversos pesquisadores têm considerado os hidrogéis como opção interessante para uso na engenharia tecidual, particularmente devido ao seu fácil manuseio, bem como a importante capacidade deste produto se adaptar em sítios com anatomia irregular e conseqüentemente de difícil acesso²⁵⁻²⁶. A maioria dos hidrogéis apresenta característica muito similar à matriz extracelular do tecido conjuntivo, tais como alta umidade e propriedades reológicas que lhe confere plasticidade²⁷⁻²⁹. Uma vez aplicado sobre a loja cirúrgica, o hidrogel atua como material de preenchimento biocompatível. Então, ele é gradualmente degradado à medida que é substituído pelo novo tecido semelhante ao de origem, permitindo assim que o processo de regeneração ocorra no local^{3,29}.

A associação de biomateriais com agentes de sinalização tem sido demonstrada para induzir a regeneração tecidual guiada da polpa dental¹⁹. Dentre as substâncias que apresentam propriedades bioativas, diversas proteínas da matriz extracelular (PMEs), tais como fibronectina, laminina e colágeno I, têm sido propostas como elementos quimiotáticos e indutores, visto que participam de processos de reparação e remodelação tecidual^{30,31}. Também já foi demonstrado que estas proteínas participam do processo de adesão e espalhamento celular³²⁻³⁴, bem como podem induzir a migração, proliferação e diferenciação celular^{31,35,36}. Um estudo recente, Bullard et al.³⁷ caracterizaram a composição do cordão umbilical humano liofilizado e avaliaram seus efeitos biológicos in vitro e in vivo. Os autores observaram que o cordão umbilical humano contém colágeno tipo I, ácido hialurônico, fibronectina e laminina, bem como fatores de crescimento, moduladores inflamatórios e outros reguladores de sinalização celular. Aumento da migração de fibroblastos e da proliferação de células indiferenciadas de origem mesenquimal e do tecido adiposo, associado a indução do potencial angiogênico, ocorreu quando as

células foram expostas a este biomaterial liofilizado. Esses efeitos *in vitro* foram concentração-dependente. Bullard et al.³⁷ também demonstraram que quando implantado em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, o biomaterial preparado com cordão umbilical liofilizado mostrou-se biocompatível e biodegradável.

A fibronectina tem se mostrado um potente agente de sinalização, capaz de mediar a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, apresentando assim, papel importante nos processos de formação, remodelação, reparação e regeneração tecidual³⁸⁻⁴⁰. A laminina tem sido descrita como uma macromolécula extracelular complexa que regula a migração, adesão e proliferação celular^{41,42}. Especialmente na reepitelização e angiogênese, a laminina tem se mostrado essencial para manter as funções celulares⁴¹. O colágeno, por sua vez, é uma proteína abundante na matriz extracelular que caracteriza o microambiente localizado entre as células de todo o organismo. Sabe-se que mais de 90% do colágeno encontrado nos tecidos é do tipo I³⁹. Esta proteína, a qual tem sido utilizada para mimetizar o microambiente *in vivo*, também tem potencial para promover a proliferação e diferenciação de células tronco^{39,43}.

Assim, com base nos importantes resultados de estudos disponibilizados na literatura e diante das limitações encontradas no tratamento convencional de dentes com rizogênese incompleta, torna-se necessário o desenvolvimento de promissores biomateriais associados a um potente agente de sinalização, de modo que estes possam atuar na terapia regenerativa endodôntica guiada por meio da indução de células da papila apical humana (hAPCs).

4 CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias empregadas no presente estudo laboratorial, os quais resultaram na preparação dos artigos científicos 1*, 2* e 3* que foram submetidos para publicação em periódicos qualificados pela CAPES e de forte impacto para a área do conhecimento, foi possível concluir que:

1. As concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de fibronectina pode atuar como um potente agente bioativo sobre hAPCs, estimulando a adesão, proliferação e espalhamento celular, bem como a síntese de colágeno e expressão de genes relacionados à regeneração pulpar;
2. Scaffolds tubulares, formados por nanofibras alinhadas a base de 10% de poli-caprolactona e revestidas com uma dose quimiotática e bioativa de fibronectina (10 $\mu\text{g/mL}$) para as hAPCs, apresentou-se como um promissor biomaterial com potencial para ser aplicado na regeneração pulpar de dentes com rizogênese incompleta;
3. A incorporação de fibronectina (10 $\mu\text{g/mL}$) num hidrogel à base de colágeno/gelatina na proporção de 8:2, resultou no desenvolvimento de um biomaterial com ação quimiotática e bioativa sobre hAPCs, o qual tem potencial para ser aplicado no preenchimento do canal radicular de dentes com rizogênese incompleta e estimular a regeneração do tecido pulpar.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. Silujjai J, Linsuwanont P. Treatment outcomes of apexification or revascularization in nonvital immature permanent teeth: a retrospective study. *J Endod.* 2017; 43(2): 238-45.
3. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod.* 2014; 40(2): 192-8.
4. Bottino MC, Pankajakshan D, Nör JE. Advanced scaffolds for dental pulp and periodontal regeneration. *Dent Clin North Am.* 2017; 61(4): 689-711.
5. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16(7): 997-1004.
6. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J.* 2011; 44(10): 889-906.
7. Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res.* 2013; 92(11): 970-5.

* 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>

8. Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(3-4): 550-63.
9. Li X, Ma C, Xie X, Sun H, Liu X. Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system. *Acta Biomater*. 2016; 35: 57-67.
10. Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. Pulp regeneration by 3-dimensional dental pulp stem cell constructs. *J Dent Res*. 2018; 97(10): 1137-43.
11. Zhang S, Zhang W, Li Y, Ren L, Deng H, Yin X, Gao X, Pan S, Niu Y. Cotransplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and endothelial cells for angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Life Sci*. 2020; 255: 117763.
12. Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2014; 93(12): 1222-31.
13. Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Control Release*. 2015; 219: 119-28.
14. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Delivery Rev*. 2008; 60(2): 184–98.
15. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res*. 2012; 91(3): 227-34.
16. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod*. 2014; 40(4 Suppl): S41-5.

17. Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M. Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(2): 158-66.
18. Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019; 25(1): 78-88.
19. Galler KM, Widbiller M. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2020; 46(9S): S143-9.
20. Duarte PCT, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marçal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. *J Endod.* 2014; 40(4): 538-42.
21. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, et al. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9(11): E116-23.
22. Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, Dev VR, Low S, Choon AT, et al. Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009; 5(7): 2560-9.
23. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011; 98(2): 379-86.
24. Teh TK, Toh SL, Goh JC. Aligned hybrid silk scaffold for enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into ligament fibroblasts. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011; 17(6): 687-703.

25. Chrepa V, Austah O, Diogenes A. Evaluation of a commercially available hyaluronic acid hydrogel (restylane) as injectable scaffold for dental pulp regeneration: an in vitro evaluation. *J Endod.* 2017; 43(2): 257-62.
26. Silva CR, Babo PS, Gulino M, Costa L, Oliveira JM, Silva-Correia J, et al. Injectable and tunable hyaluronic acid hydrogels releasing chemotactic and angiogenic growth factors for endodontic regeneration. *Acta Biomater.* 2018; 77: 155-71.
27. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp regeneration: current approaches and future challenges. *Front Physiol.* 2016; 7: 58.
28. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J.* 2018; 51(4): 405-19.
29. Medina-Fernandez I, Celiz AD. Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. *Biomater Sci.* 2019; 7(2): 506-19.
30. Lawson CD, Burridge K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases.* 2014; 5: e27958.
31. Battista S, Guarnieri D, Borselli C, Zeppetelli S, Borzacchiello A, Mayol L, et al. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. *Biomaterials.* 2005; 26(31): 6194-207.
32. 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.
33. 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.

34. 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.
35. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod.* 2010; 36(12): 1963-6.
36. 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.
37. Bullard JD, Lei J, Lim JJ, Masee M, Fallon AM, Koob TJ. Evaluation of dehydrated human umbilical cord biological properties for wound care and soft tissue healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019; 107(4): 1035-46.
38. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 4-27.
39. Sivaraman K, Shanthi C. Matrikines for therapeutic and biomedical applications. *Life Sci.* 2018; 214: 22-33.
40. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Mozzoni B, Lumetti S, Macaluso GM. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Jpn Dent Sci Rev.* 2020; 56(1): 50-5.
41. Iorio V, Troughton LD, Hamill KJ. Laminins: roles and utility in wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4(4): 250-63.
42. Polisetti N, Sorokin L, Okumura N, Koizumi N, Kinoshita S, Kruse FE, et al. Laminin-511 and -521-based matrices for efficient ex vivo-expansion of human limbal epithelial progenitor cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 5152.

43. Kwon YS, Lee SH, Hwang YC, Rosa V, Lee KW, Min KS. Behaviour of human dental pulp cells cultured in a collagen hydrogel scaffold cross-linked with cinnamaldehyde. *Int Endod J.* 2017;50(1):58-66.