



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. Denófrio 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 scaffolds 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 consequente 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 de 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.

2 PROPOSIÇÃO

A partir do contexto fundamentado, a proposta do presente estudo é sintetizar e caracterizar *scaffolds* de nanofibras a base de policaprolactona (PCL) incorporados com hidróxido de cálcio (HC), bem como avaliar seu potencial tóxico e bioatividade sobre células da polpa dental humana (HDPCs) quando associados à fibronectina (FN).

Para tanto, são objetivos específicos:

Estudo 1: Sintetizar *scaffolds* de nanofibras a base de PCL contendo ou não hidróxido de cálcio e caracterizar esses *scaffolds* quanto a morfologia, incorporação de cálcio, solubilidade, liberação de cálcio e alteração de pH, bem como avaliar seu efeito sobre HDPCs;

Estudo 2: Avaliar a influência da incorporação de hidróxido de cálcio e/ou fibronectina à *scaffolds* de nanofibras a base de PCL sobre a migração, adesão, espalhamento, viabilidade, proliferação, expressão gênica de marcadores odontogênicos e atividade de fosfatase alcalina de HDPCS, além da formação de nódulos de mineralização.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Complexo Dentino-Pulpar

O conjunto de tecidos mineralizados que forma o elemento dental, esmalte e dentina, é responsável pela proteção de um tecido conjuntivo altamente diferenciado, a polpa dentária⁴⁵. A dentina e a polpa são tecidos de mesma origem embrionária, porém com características próprias bem distintas. Por estarem conectados e serem interdependentes, formam uma unidade denominada complexo dentino-pulpar^{6,46}.

Durante os estágios iniciais da odontogênese a interação entre as células epiteliais da lâmina dentária e as células mesenquimais do tecido conjuntivo subjacente são responsáveis pela formação da polpa embrionária¹. Células mesenquimais são estimuladas a se diferenciarem em pré-odontoblastos. Os pré-odontoblastos em contato com a lâmina basal se alinham em uma única camada, e após diferenciação em odontoblastos (denominados primários), iniciam a sua atividade secretória, com a deposição de matriz dentinária^{1,45}. À medida que essa matriz sofre mineralização, esses odontoblastos migram no sentido centrípeto deixando seu prolongamento no interior do novo tecido dentinário formado, enquanto o corpo celular dos odontoblastos é mantido afastado da dentina mineralizada pela pré-dentina^{1,45}. Esse processo é contínuo até que a espessura da dentina seja atingida. Devido a presença dos prolongamentos celulares, a dentina é um tecido tubular semi-permeável^{6,8,9}, e, portanto, permite a difusão de agentes tóxicos ao tecido pulpar, como por exemplo, produtos do metabolismo microbiano do biofilme dentário e produtos provenientes de materiais dentários⁴⁷.

As células localizadas a uma maior distância da lâmina basal, e, portanto, não diferenciadas em odontoblastos, são importantes para a reposição dos odontoblastos primários que sofrem apoptose ao longo da vida funcional da polpa¹, assim como para o processo de reparação tecidual^{35,48}. Quando a intensidade da agressão supera a capacidade de defesa da polpa, ocorre morte dos odontoblastos primários⁷. Para repor os odontoblastos perdidos, células mesenquimais indiferenciadas presentes na camada rica em células do tecido pulpar são recrutadas³⁵. A dentina humana possui fatores de crescimentos como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I e IGF -II), o fator de crescimento derivado do esqueleto (SGF), o fator de crescimento transformador (TGF- β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que são liberados quando a dentina sofre um processo de desmineralização, seja ela por cárie ou

materiais odontológicos. Esses fatores estão relacionados com o recrutamento das células mesenquimais indiferenciadas³⁵.

3.2 Tratamento da Polpa Exposta

Durante o período que um dente está em função, diversas situações podem romper a integridade dos tecidos mineralizados que protegem o tecido pulpar, como lesões de cárie profundas, preparos cavitários ou traumas⁴⁹. Quando a polpa exposta não apresenta sinais de inflamação irreversível, evidenciando a capacidade de reparação tecidual, deve-se lançar mão de procedimentos de terapia pulpar vital (TPV)⁴⁹. São considerados TPV aqueles procedimentos capazes de induzir a formação de dentina terciária (denominada de dentina reparadora no presente contexto) e manter a vitalidade pulpar⁴⁹. Adicionalmente, é desejado que o material aplicado sobre a exposição pulpar também seja antimicrobiano, adesivo à dentina e aos materiais restauradores, tenha adequada resistência mecânica, liberação de íons como flúor e cálcio, seja esterilizável, radiopaco e promova um adequado selamento^{3,49}.

Os materiais aplicados sobre a polpa exposta podem induzir diferentes respostas do tecido pulpar, na dependência de sua composição química e da concentração dos componentes presentes no material^{7,16,47}. Os materiais mais utilizados atualmente para o capeamento pulpar direto são divididos em dois grupos: materiais a base de hidróxido de cálcio e materiais a base de silicato de cálcio.

Hidróxido de cálcio é considerado o padrão ouro para o tratamento de exposições pulpares⁵. Seu mecanismo de ação é explicado, em parte, pela solubilização de moléculas bioativas presentes na matriz dentinária, como o TGF- β 1 e proteínas não colagenosas¹⁰. Essas moléculas bioativas parecem ser importantes para induzir mudanças na expressão gênica de células mesenquimais indiferenciadas presentes na polpa, levando a modificações na atividade funcional das células e contribuindo para a formação de dentina terciária^{2,10}. O elevado pH do material também induz a necrose de coagulação superficial da polpa, seguida da formação de uma barreira mineralizada composta por duas zonas: uma de calcificação distrófica com uma matriz atubular fibrosa, e outra com um tecido mais semelhante a dentina secundária, com a presença de túbulos e revestido por células odontoblastóides^{35,44}. A presença de defeitos do tipo túnel nessa barreira e a solubilidade do material capeador são motivos pelos quais o selamento das exposições pulpares é

imperfeito¹². Além disso, esse processo causa uma grande perda tecidual evidenciada pelo formato convexo da barreira projetada para o interior da polpa⁴⁴.

Um dia após o capeamento pulpar direto da polpa dentária humana com hidróxido de cálcio, a zona de calcificação distrófica já apresenta reação positiva para a fibronectina, detectada por imunofluorescência³⁵. Células pulpares foram atraídas para essa zona 7 a 10 dias após capeamento pulpar, e aos 14 dias essas células apresentavam-se alinhadas, algumas com aspecto alongado semelhante a odontoblastos³⁵. No processo de dentinogênese reparativa também ocorre a ativação da proteína de membrana 165kDa, a qual induz a reorganização do citoesqueleto tornando essas células alongadas e polarizadas¹, além da expressão de genes como sialofosfoproteína da dentina (DSPP) e proteína da matriz dentinária (DMP-1), evidenciando a diferenciação em células odontoblastóides⁵⁰.

Os materiais a base de silicato de cálcio, também denominados de cimentos biocerâmicos, como o agregado trióxido mineral (MTA) e o Biodentine® apresentam mecanismo de ação similar aos materiais a base de hidróxido de cálcio, ou seja, solubilização da matriz dentinária com liberação de moléculas bioativas e necrose de coagulação superficial^{49,51}. Portanto, também ocorre perda tecidual em resposta a materiais a base de silicato de cálcio^{11,12}. Entretanto, a formação de uma barreira mineralizada mais espessa, menor frequência de hiperemia e menor área de necrose de coagulação têm sido comumente observadas para esses materiais biocerâmicos¹².

3.3 Engenharia Tecidual

A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar que busca alternativas para regenerar, manter ou melhorar a função de algum tecido¹⁴. Utilizando-se de uma estrutura tridimensional, que mimetiza a matriz extracelular, associada a moléculas de sinalização, que servirá de arcabouço temporário para as células se aderirem, proliferarem e secretarem um novo tecido¹⁴, a engenharia tecidual tem ganhado espaço em aplicações nos tecidos craniofaciais e na odontologia¹³⁻¹⁵.

Quando existe uma fonte de células indiferenciadas endógena, é possível utilizar essas células como um dos pilares da engenharia tecidual. Essa abordagem é conhecida como *cell-free*¹⁵ e o tecido pulpar é um bom candidato para esse tipo de abordagem, por possuir células mesenquimais indiferenciadas tanto na polpa quanto na região da papila apical, responsável pelo desenvolvimento radicular¹⁵. Além da população celular, outros dois pilares compõem a tríade da engenharia tecidual, um

arcabouço (ou *scaffold*) para abrigar temporariamente as células e moléculas sinalizadoras para bioestimular o processo de recrutamento e diferenciação celular¹⁵.

3.4 *Scaffolds*: Arquitetura e Composição

Os *scaffolds* desempenham um papel chave no processo de regeneração tecidual guiada por servirem de arcabouço tridimensional temporário para a ancoragem celular. A arquitetura e a composição do *scaffold* influenciam a resposta das células, e, portanto, a definição dessas características deve ser feita de acordo com o tecido que se busca regenerar^{26,52}. A topografia do substrato por si só influencia o comportamento celular, induzindo a migração e afetando o arranjo do citoesqueleto^{53,54}. Visando a regeneração do complexo dentino-pulpar, diversas arquiteturas já foram testadas para simulação da matriz extracelular temporária, desde hidrogéis até superfícies nanofibrilares^{24,40,55}.

Tem sido demonstrado que diferentes formulações de hidrogéis injetáveis a base de polietilenoglicol, hialuronano e gelatina, associados a fibronectina, são compatíveis com células tronco da polpa dental humana (hDPSCs), estimulando a proliferação celular⁴⁰. Porém, para exposições pulpares, onde seria necessário sobrepor um material restaurador, hidrogéis injetáveis não parecem ser a melhor opção. *Scaffolds* porosos a base de quitosana demonstraram ser uma alternativa viável para o recobrimento de exposições pulpares. Várias associações estimularam a diferenciação odontogênica de células da polpa dental humana (HDPCs)^{21,32,56}. Uma característica morfológica importante para permitir a troca metabólica entre as células que povoam o *scaffold* e a migração celular para o interior do *scaffold* é a interconectividade dos poros⁵². Soares e colaboradores^{21,56} desenvolveram diversas formulações de *scaffolds* porosos a base de quitosana como uma alternativa para o selamento de exposições pulpares. A incorporação de diferentes partículas aumentou os espaços interfibrilares e interconectividade dos poros. Essas formulações estimularam a diferenciação odontogênica em células da polpa dental humana (HDPCs).

A topografia nanofibrilar também vem sendo investigada para o mesmo objetivo. As nanofibras assemelham-se ao arranjo da matriz extracelular, e são capazes de aumentar a adesão e proliferação de células da polpa dental humana¹⁸. Em comparação com a arquitetura porosa, a nanofibrilar proporcionou, *in vitro*, aumento na proliferação, adesão e diferenciação odontogênica de hDPSCs, além de

maior deposição de matriz mineralizada quando avaliada *in vivo* em *scaffolds* implantados na região subcutânea de camundongos⁵⁵.

A técnica de *electrospinning* para a obtenção de nanofibras é amplamente utilizada na fabricação de *scaffolds* para engenharia tecidual. Essa técnica é considerada simples, econômica e versátil⁵⁷. São necessários três componentes: uma bomba de injeção automática, um coletor e uma fonte de alta tensão⁵⁷. Assim, uma seringa contendo a solução polimérica que se deseja eletrofiar deve ser acoplada a bomba de injeção automática fixada a uma distância pré-estabelecida do coletor e ajustada à velocidade específica para cada polímero. Um campo elétrico é formado entre a seringa e o coletor. A gota que é ejetada da seringa torna-se altamente eletrificada devido ao acúmulo de cargas em sua superfície. Essa gota torna-se alongada, formando uma estrutura cônica, denominada Cone de Taylor. Uma vez que o campo elétrico exceder a tensão superficial do polímero, este será atraído para o coletor em forma de jato. Durante esse processo o solvente será evaporado, sendo então formadas fibras sólidas sobre o coletor com diâmetros variados⁵⁷⁻⁵⁹.

Além da arquitetura do *scaffold*, a composição das fibras pode influenciar nas interações entre a célula e o *scaffold*. A modificação de nanofibras de poli (ácido-lático) com esferas de gelatina, por exemplo, aumentou a adesão, espalhamento e proliferação celular em um dia de cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1), além de induzir a uma maior formação de matriz mineralizada após 14 dias de cultura⁶⁰. Outra maneira de modificar a superfície das fibras que compõem o *scaffold* é a incorporação de partículas ao polímero, como hidroxiapatita ou outras fases minerais²⁹. A composição química do *scaffold* também influencia o tempo de degradação⁶¹, a produção de subprodutos de degradação, a processabilidade e a possibilidade de incorporação de partículas ou adsorção de substâncias^{25,27}. Diversos polímeros vêm sendo investigados para a fabricação de *scaffolds* nanofibrilares como a quitosana, o ácido poliglicólico (PGA), o ácido polilático (PLA) e a polieterimida (PEI)^{22,55,59}. Policaprolactona (PCL) é um polímero que tem voltado a ganhar destaque, biomaterial muito utilizado como sistema de distribuição controlada de fármacos²³. Com o avanço da engenharia tecidual, o PCL voltou a ser utilizado como material de escolha por possuir baixo custo²⁵ e propriedades desejáveis como boa processabilidade, baixa solubilidade, baixo ponto de fusão, biocompatibilidade²⁴ e a capacidade da incorporação de partículas e/ou carregamento com fármacos²⁵⁻²⁷.

A incorporação de tri-cálcio fosfato ao PCL (20%) conferiu ao *scaffold* produzido com esse polímero um padrão de degradação adequado para a regeneração de tecido ósseo, *in vitro* e *in vivo*⁶¹. O tempo médio de degradação foi de 5-6 meses e as propriedades resultantes (porosidade, módulo de elasticidade e resistência a compressão) demonstraram que a degradação *in vivo* aconteceu mais rapidamente quando comparada com a *in vitro* quando os *scaffolds* permaneceram imersos em meio de cultura⁶¹. Outra associação com efeitos positivos para aplicação na engenharia tecidual foi a de uma biomolécula hidrofílica (HSA; albumina sérica humana), ao polímero hidrofóbico (PCL). Essa combinação permitiu a formação de uma malha de fibras de menor diâmetro entre as nanofibras de PCL, resultando em melhor espalhamento celular e aumento da viabilidade de pré-osteoblastos (MC3T3-E1)⁶².

Diferenças na morfologia e na atividade biológica dos *scaffolds* podem ser observadas em função da concentração do PCL no momento da eletrofiação. Em um trabalho recente²⁴, foi demonstrado que o PCL na concentração de 10%, diluído em solução de clorofórmio/dimetilformamida, apresentou melhores resultados de adesão, espalhamento e proliferação de células da polpa dental humana (HDPCs), quando comparadas com concentrações maiores (12,5% e 15%), além de formar nanofibras com menor diâmetro e aumentar o espaço interfibrilar, permitindo uma melhor interação entre as células.

3.5 Moléculas de Sinalização

Moléculas ou agentes de sinalização são o terceiro pilar da tríade que compõe a base conceitual da engenharia tecidual e tem como função a quimiotaxia e indução de diferenciação celular¹⁴. A depender do tamanho ou tipo do defeito, as moléculas de sinalização endógenas não são suficientes para o adequado processo de regeneração, portanto se faz necessária a adição de moléculas exógenas (Ma, 2008). São utilizados como moléculas de sinalização fatores de crescimento, como o TGF- β ¹⁶³, proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina⁶⁴⁻⁶⁶, e diferentes fases minerais, como a nanohidroxiapatita²⁹ e o hidróxido de cálcio⁵⁶.

Para a regeneração do tecido dentinário é importante que as células expressem um fenótipo odontoblástico⁶⁷). Tem sido demonstrado que a incorporação de partículas contendo cálcio e/ou fosfato em *scaffolds* de nanofibras regulam

positivamente a expressão de genes marcadores de diferenciação odontogênica em células da polpa dental humana, como ALPL, DSPP e DMP1^{56,67}.

Parte da bioatividade dos materiais utilizados atualmente para capeamento pulpar direto, como o hidróxido de cálcio, está associada à sua alta solubilidade e capacidade de liberação de íons Ca^{2+} e OH^- ^{7,68-70}. Da dissociação do HC em água, um dos íons gerados é OH^- , responsável pela modulação de pH do meio^{68,71}. Células da polpa dental humana cultivadas em meio levemente alcalino (pH 7,8) apresentam maior atividade de fosfatase alcalina e expressão de BMP-2 (proteína morfogenética óssea), culminando com a produção de um maior número de nódulos de mineralização, quando comparado ao grupo de células cultivadas em meio neutro (pH 7,2)³³. Também já foi demonstrado aumento da proliferação e migração de HDPCs mantidas em meio com pH 7,9 quando comparado a células mantidas em meios com diferentes pH, desde um meio ácido (pH 3,5) até altamente alcalino (pH 12,5)⁷².

A presença de íons Ca^{2+} no ambiente extracelular é importante para a diferenciação de células da polpa dental humana (HDPCs) em células com fenótipo odontoblástico⁷³. Tem sido demonstrado que o aumento da concentração de cálcio extracelular influencia a expressão de osteocalcina e osteopontina, proteínas essenciais para a mineralização tecidual⁷³. A ativação de canais de cálcio tipo L, ativando as vias CAM-CAMK2 em pré-osteoblastos (MC3T3-E1) expostos à íons Ca^{2+} liberados de nano-hidroxiapatita resultou em aumento de expressão de sialoproteína óssea e osteopontina, sugerindo que o Ca^{2+} liberado propiciou um ambiente favorável para a diferenciação odontoblástica⁷⁴.

A estimulação da produção de fibronectina por HDPCs é outro mecanismo atribuído ao Ca^{2+} liberado do HC⁷⁵. A fibronectina é uma glicoproteína da matriz extracelular que tem como função a quimiotaxia e a promoção da adesão e espalhamento celular³⁸⁻⁴⁰, bem como, a proliferação e a diferenciação celular^{35,37,41,42}. Em polpas expostas tratadas com HC, é possível observar marcação positiva para fibronectina entre a camada superficial de necrose e a polpa remanescente desde o primeiro dia após o capeamento pulpar³⁵. Após 7 dias, células pulpares migraram para a zona de necrose, enquanto aos 14 dias foi possível observar a formação de uma camada de células odontoblatóides alinhadas adjacente a região de matriz fibrosa que continha a presença de fibronectina³⁵.

Além das fases minerais, também tem sido demonstrado que a incorporação de proteínas da matriz extracelular, como a própria fibronectina, a composição dos

scaffolds pode induzir a migração das células residentes do tecido e a expressão de fenótipo celular característico, guiando a regeneração tecidual^{41,42,76}. A incorporação de 100 µg/mL de fibronectina em *scaffolds* de ácido polilático com arquitetura nanofibrilar aumenta a adsorção de proteínas como albumina, vitronectina, laminina e da própria fibronectina em até quatro vezes quando comparado com *scaffolds* sólidos⁶⁵. HDPCs semeadas sobre *scaffolds* de quitosana incorporados com 100 µg/mL de fibronectina apresentaram forte adesão⁶⁴ e uma maior organização do citoesqueleto, o qual apresentou feixes mais alongados³⁹. Em um estudo recente⁶⁶, *scaffolds* de PCL (10%) foram carregados com 5 ou 10 µg/mL de FN e avaliados quanto a sua bioatividade sobre células da papila apical de dente humano (hAPCs) e a maior ação quimiotática foi vista para os quando os *scaffolds* continham 10 µg/mL de FN. Os autores também observaram maior migração, viabilidade, proliferação, adesão e espalhamento das células da papila sobre os *scaffolds* com o aumento da concentração de FN. Entretanto, nenhuma fase mineral foi incorporada a esses *scaffolds* nanofibrilares.

3.6 Lacuna e Problematização

Grande parte do conhecimento atual a respeito do efeito de *scaffolds* sobre eventos celulares como migração, diferenciação e proliferação, entre outros, foi gerado para o tecido ósseo^{26,29,30,60}. Uma vez que células da polpa dental humana (HDPCs) com capacidade de diferenciação em células odontoblastóides compartilham algumas semelhanças fenotípicas com os osteoblastos³⁴ é plausível a transferência da evidência construída para o tecido ósseo para o tecido pulpar. Entretanto, até o presente momento, não foram encontradas na literatura evidências sobre os efeitos da associação de *scaffolds* de arquitetura nanofibrilar de PCL, do hidróxido de cálcio e da fibronectina sobre a regeneração do complexo dentino-pulpar.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo 1 – Síntese e Caracterização de *Scaffolds* Experimentais de Nanofibras Associados à Hidróxido de Cálcio e Seu Efeito Sobre Células da Polpa Dental Humana (HDPCS)

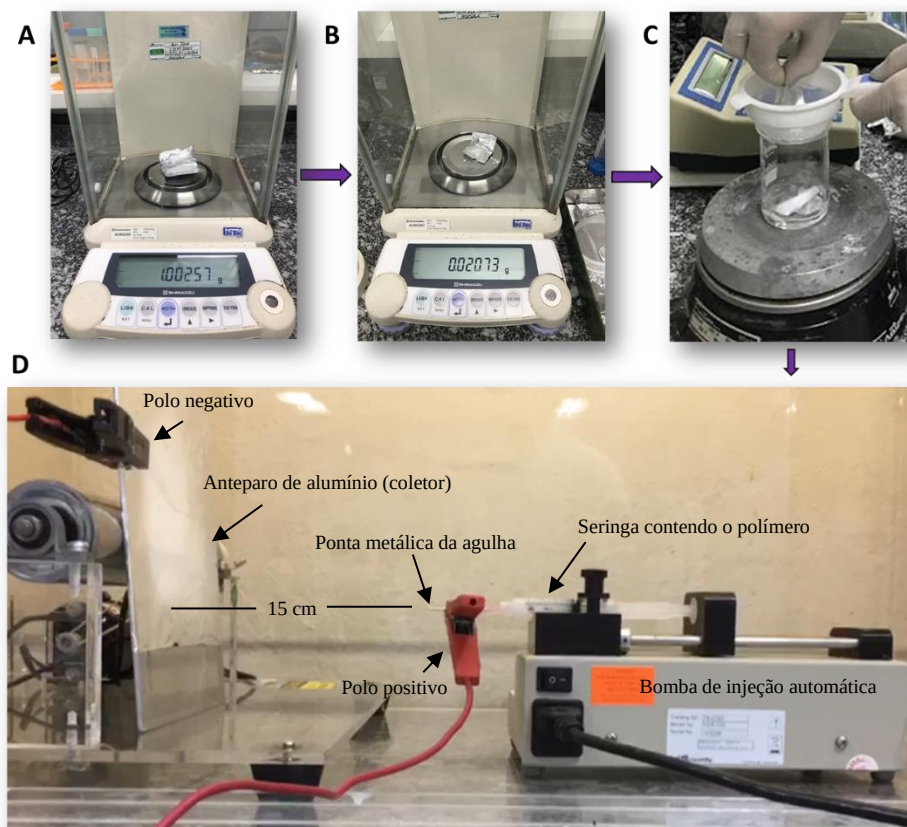
4.1.1 Confeção de *scaffolds* pela técnica de *electrospinning*

Soluções de 10% (m/v) de policaprolactona (PCL; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA)²⁴ foram preparadas utilizando como solvente uma mistura de clorofórmio/dimetilformamida na concentração de 80:20 (v:v) (Neon Comercial Ltda., Suzano, SP, Brasil). Essas soluções foram mantidas sob agitação magnética em temperatura ambiente por 12 h. Em seguida, concentrações de hidróxido de cálcio (HC; 0,1%, 0,2% ou 0,4%; m/v) (Sigma-Aldrich) foram adicionadas a essas soluções (Figura 1), as quais foram novamente mantidas sob agitação magnética por mais 24 h. A solução controle, composta apenas por PCL, foi mantida sob agitação pelo mesmo período.

A confecção dos *scaffolds* de nanofibras foi realizada por *electrospinning*. Para isso, cada solução a ser testada foi transferida para uma seringa de 5 mL com agulha de aço inoxidável gauge 18 (Anhui Easyway Supplies Co., Tianchang, Anhui, China), a qual foi acoplada a uma bomba de injeção automática (KD Scientific, Holliston, MA, EUA), programada para atuar a uma velocidade de 1 mL/h durante 1 hora. A voltagem da fonte de alta tensão foi de 13 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor de 15 cm. Para obtenção dos *scaffolds* de nanofibras foram utilizadas lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) posicionadas em um coletor plano coberto com uma folha de papel alumínio e fixadas com 2 µL de água deionizada. O coletor foi disposto perpendicularmente à seringa (Figura 1) e os *scaffolds* foram retirados da área central da eletrospiação, a fim de obter maior uniformidade de espessura e morfologia. A seguir, os *scaffolds* foram submetidos à secagem em dessecador à temperatura ambiente pelo período de 72 h para eliminação do solvente residual. Os conjuntos *scaffolds* e lamínula foram acondicionados em placas de 24 compartimentos e submetidos ao protocolo de lavagem/esterilização²² com etanol 50% (10 min – 1×), etanol 70% (20 min – 3×) e PBS (solução tampão fosfato-salino; 0,14M NaCl, 0,0017M KH₂PO₄, 0,003M KCl,

0,01M Na_2HPO_4 ; pH~7) (10 min – 2×) para a realização dos testes. Os grupos experimentais estão descritos no Quadro 1.

Figura 1- Confecção das nanofibras por meio da técnica de *electrospinning*. **(A)** Pesagem da policaprolactona (PCL) em balança de alta precisão; **(B)** Pesagem do hidróxido de cálcio em balança de alta precisão; **(C)** Incorporação da fase mineral ao PCL já diluído em clorofórmio/dimetilformamida sob agitação magnética, mantida por 24 h após a mistura; **(D)** Bomba de injeção automática acoplada a fonte de alta tensão e seringa de 5 mL contendo a solução de PCL. O polo negativo foi conectado ao coletor e o positivo a ponta metálica da agulha, a uma distância de 15 cm.



Fonte: Elaboração própria.

Quadro 1- Grupos experimentais da primeira fase (Estudo 1).

Grupos	Concentração de hidróxido de cálcio
PCL	-
PCL+0,1% HC	0,1%
PCL+0,2% HC	0,2%
PCL+0,4% HC	0,4%

PCL = Policaprolactona; HC = Hidróxido de cálcio

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2 Caracterização morfológica dos *scaffolds* (n=4)

Apenas para essa análise, a eletrofição foi feita diretamente sobre a folha de papel alumínio (sem a interposição de lamínula de vidro) por 30 minutos. Os *scaffolds* foram cortados com o auxílio de um *punch* dermatológico (Figura 2) de 3 mm de diâmetro (Kolplast, Itupeva, SP, Brasil), fixados em *stubs* metálicos (Figura 2), cobertos com ouro e analisados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado com sistema EDS (espectroscopia de raio-x por dispersão de energia), para caracterização estrutural e avaliação da incorporação da fase mineral nas nanofibras (20 kV; FEI Inspect S50, FEI, Hillsboro, OR, EUA). Foram mensurados o diâmetro das nanofibras e o tamanho dos poros. Para tanto, foram obtidas 3 imagens de cada amostra no aumento de 2000× e 4000×, e em cada imagem no aumento de 4000×, foram aleatoriamente selecionadas 50 nanofibras para a avaliação do diâmetro.

O número total de nanofibras analisado por grupo (n=600) foi utilizado para mapear a distribuição dos diâmetros. Para a comparação entre os grupos, primeiro foi calculada a média do diâmetro das nanofibras de cada imagem, seguida pelo cálculo da média das 12 imagens para a determinação da média do grupo.

Nas fotomicrografias de 2000× foi avaliada a porcentagem de porosidade dos *scaffolds* por imagem (n=12). Ambas as análises foram realizadas por meio do programa ImageJ (NIH, National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

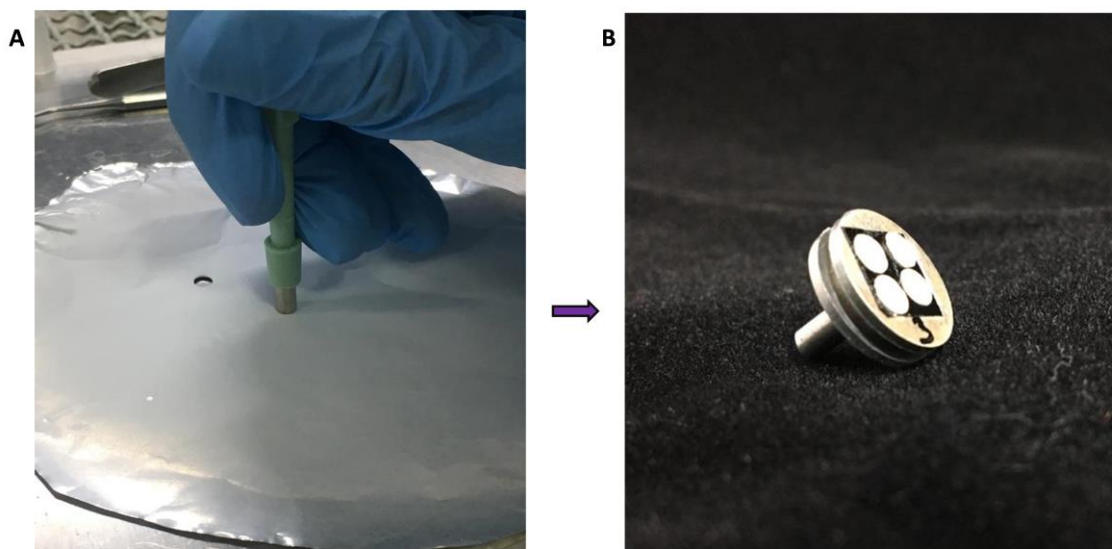
4.1.3 Ensaio de degradação hidrolítica (n=8)

Inicialmente, para a realização desta análise, os *scaffolds* de nanofibras (13 mm diâmetro) foram mantidos em 500 µL de água destilada por 2 h. A seguir, após secagem por 30 min em estufa a 37 °C, os *scaffolds* foram pesados em balança de

alta-precisão (Microbalança XS106, Mettler-Toledo International Inc., Columbus, OH, EUA) para obtenção da massa inicial (M1). Então, estes *scaffolds* foram novamente armazenados imersos em água destilada pelos períodos de 1, 7, 14 e 21 dias. Em cada um desses períodos, as amostras foram submetidas novamente à secagem em estufa a 37°C por 30 min para pesagem da massa (M2). Assim, a porcentagem de perda de massa, em cada tempo de análise proposto, foi determinada pela equação:

$$\% \text{ de perda de massa} = 100 - (M2 \times 100 / M1)$$

Figura 2- Preparo dos *scaffolds* para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **(A)** Obtenção das amostras com o auxílio de um *punch* dermatológico (3 mm de diâmetro); **(B)** amostras montadas em *stub* metálico (n=4).



Fonte: Elaboração própria.

4.1.4 Liberação de cálcio e alteração de pH do meio (n=8)

Os *scaffolds* de nanofibras (13 mm diâmetro) foram imersos em 500 µL de água ultrapura (pH 7,0), trocada diariamente, e a liberação de cálcio, bem como o pH da água, foram monitorados nos períodos de 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias (pHmetro condutivímetro de bancada, Hanna HI 2221; Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA). A cada período de análise, a água ultrapura mantida em contato com os *scaffolds* (extrato) foi coletada e transferida individualmente para tubos de 1,5 mL. Após a mensuração do pH, os extratos foram armazenados a -20 °C. Para

quantificação da liberação de cálcio, os extratos estocados foram descongelados em temperatura ambiente e submetidos ao ensaio experimental empregando o kit Cálcio Liquiform (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, BR), seguindo as recomendações do fabricante. Este ensaio baseia-se no princípio de reação do cálcio com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta cuja absorbância foi lida em 570 nm (Synergy H1, Hybrid Multi-mode Microplate Reader, BioTek; Winooski, VT, EUA). A quantificação de cálcio foi feita por meio de uma curva padrão (0,00; 0,06; 0,12; 0,25; 0,49; 0,98; 1,96 mM) e os resultados foram apresentados em mM.

4.1.5 Cultura celular primária

Dois terceiros molares humanos inclusos hígidos e recém-extraídos foram obtidos de dois voluntários com 18 anos de idade, os quais foram atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Para participação na pesquisa, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos (CEP) da mesma Instituição (CAAE: 18119319.9.0000.5416; ANEXO).

Após a extração, os dentes foram acondicionados imediatamente em tubos Falcon contendo α -MEM suplementado com antibiótico e antifúngico (100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina, e 0,25 g/mL Fungizone; Gibco, Ivitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Com o auxílio de uma ponta diamantada acoplada a um motor de alta rotação foi realizada uma canaleta 1 mm abaixo da junção amelo-cementária sob constante refrigeração em ambiente asséptico. Em seguida, as porções coronária e radicular foram separadas e o tecido pulpar foi cuidadosamente removido com o uso de limas endodônticas. Esse tecido foi picotado utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 15 em pequenos fragmentos, os quais foram submetidos à desagregação enzimática em solução de colagenase tipo 1 (3 mg/mL; Sigma-Aldrich). As células foram então cultivadas até a 3ª passagem em meio de cultura α -MEM (Gibco) suplementado com 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco), 2 mmol/L de glutamina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco)⁷⁷.

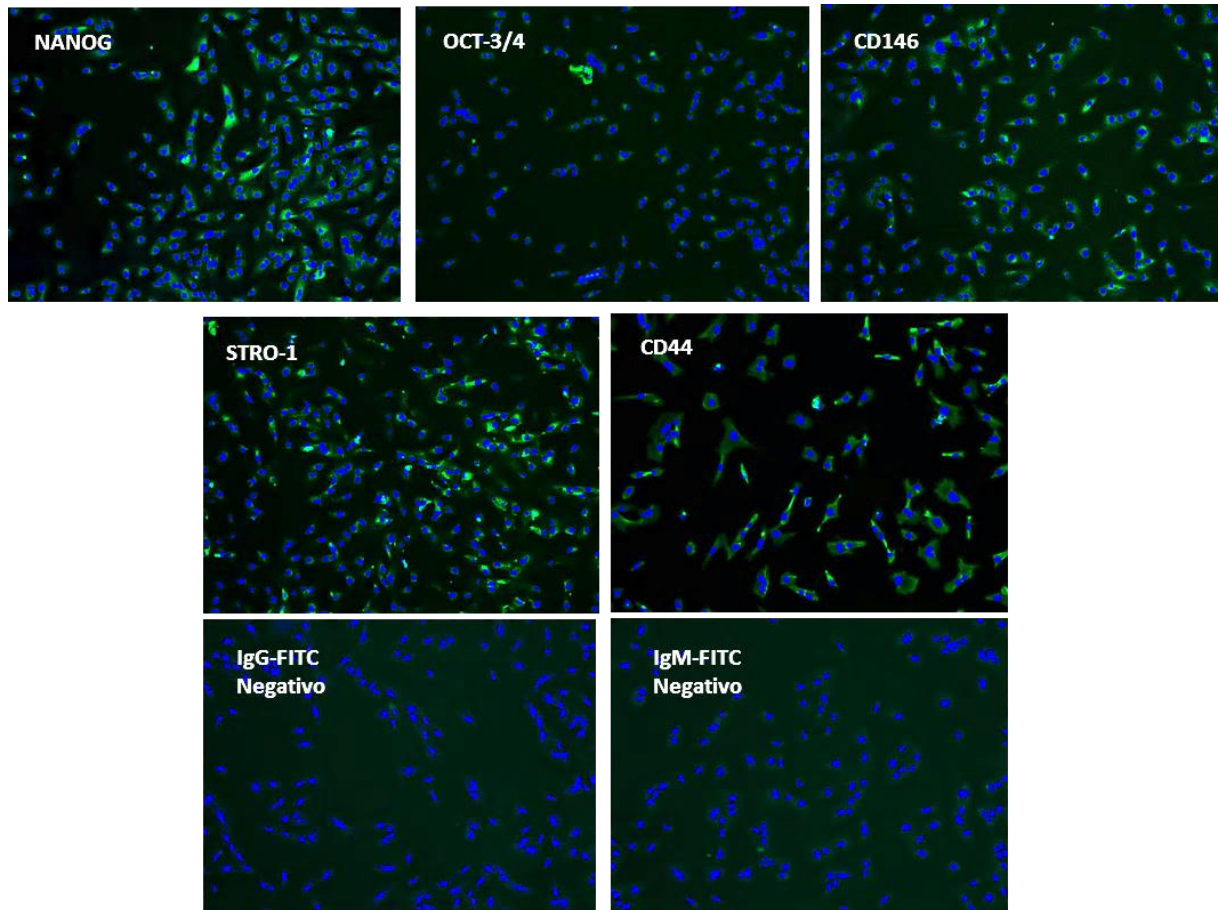
A identificação de células com potencial de diferenciação na cultura primária de polpa dental foi realizada por meio de imunofluorescência. As células foram semeadas em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Perfecta) acondicionadas em placas de 24 compartimentos (1×10^4 células/compartimento; Kasvi, São José dos Pinhais, PR,

Brasil) durante 24 h. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado (4% em PBS) por 15 minutos, submetidas a duas lavagens com PBS a 4 °C, e permeabilizadas com Triton-X 100 (0,1% em PBS; Sigma-Aldrich) por 10 min. Após 3 lavagens com PBS frio, o bloqueio foi realizado com albumina de soro bovino (BSA; 5% em PBS; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 30 min, sendo as células incubadas com anticorpos monoclonais primários anti-NANOG (IgG), anti-OCT3/4 (IgG), anti-STRO1 (IgM), anti-CD146 (IgG) e anti-CD44 (IgG) (1:50; Santa Cruz Biotechnology) por 12 h a 4 °C. Após este período, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC; 1:50; Santa Cruz Biotechnology) por 1 h, seguido de incubação com Hoechst 33342 (1:5000; Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) por 15 min, para contra-fluorescência nuclear, e então analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Assim, a marcação positiva (Figura 3) demonstrou que a cultura celular utilizada nesse estudo representa uma cultura mista de células pulpares com a presença de uma sub-população de células com capacidade de diferenciação (HDPCs – *human dental pulp cells*).

4.1.6 Avaliação biológica

Após a síntese dos *scaffolds* de nanofibras sobre lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro e protocolo de lavagem de acordo com os parâmetros estabelecidos anteriormente, estes foram mantidos em placas de 24 compartimentos contendo 500 µL de α -MEM com 10% de SFB por 12 horas. Células HDPCs entre a 3ª e 5ª passagens foram semeadas sobre os *scaffolds* (3×10^4 células/*scaffold*), sendo o meio de cultura trocado a cada 2 dias, com o objetivo de avaliar a adesão, espalhamento, viabilidade e proliferação celular, como indicadores de citocompatibilidade das diferentes formulações de *scaffold*. Para os testes de avaliação biológica foi acrescentado o grupo “Lâminula”, a fim de validar internamente a citocompatibilidade do *scaffold* de PCL sem a adição da fase mineral.

Figura 3- Paineis de imagens de imunofluorescência para marcadores de células multipotentes presentes na cultura primária de HDPCs. Aumento 10×. Fluorescência verde (FITC) indica marcação pelos anticorpos e a fluorescência azul (Hoescht) demonstra os núcleos. IgG-FITC e IgM-FITC representam os controles negativos de anticorpos secundários.



Fonte: Elaboração própria.

4.1.6.1 Adesão e espalhamento celular (n=4)

Após 1, 3 e 7 dias de contato com os *scaffolds*, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, permeabilizadas com Triton-X 100 (0,1% em PBS) e incubadas com sonda fluorescente em vermelho para filamentos de actina (1:20; reagente ActinRed™ 555 ReadyProbes™; Invitrogen) (excitação 540 nm e emissão 565 nm) em BSA 2% (albumina sérica bovina). Para detecção do núcleo foi utilizado o Hoechst 33342 (1:5000 em PBS; Invitrogen; excitação 361 nm e emissão 497 nm). A seguir, as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B).

4.1.6.2 Viabilidade e proliferação celular

Nos períodos de 1, 7 e 14 dias, os *scaffolds* (n=4) foram submetidos ao ensaio Live/Dead (Invitrogen) para verificação da presença de células vivas e mortas por meio de microscopia de fluorescência. Os *scaffolds* foram incubados, nas mesmas condições descritas anteriormente, em meio de cultura sem SFB suplementado com 4 μ M de homodímero de etídio-1 (EthD-1) e 2 μ M de calceína AM (Live/Dead cell viability/cytotoxicity kit) durante 30 min. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em lâminas de vidro para análise das células viáveis (coradas em verde; 494 nm excitação e 517 nm emissão) e em processo de morte (coradas em vermelho; 517 excitação e 617 nm emissão) na superfície dos *scaffolds* sob aumento de 10 $\times$ em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B).

O ensaio de alamarBlue (n=8) foi realizado após 1, 7 e 14 dias do plantio celular sobre os *scaffolds*. As células foram incubadas durante 3 h a 37 °C e 5% de CO₂ em α -MEM sem SFB contendo a solução de alamarBlue (Invitrogen), na proporção de 10:1. Após este período, o sobrenadante foi transferido para placas de 96 compartimentos para a leitura da fluorescência (560 nm excitação e 590 nm emissão; Synergy H1). Os valores de fluorescência foram transformados em porcentagem pela aplicação de uma regra de três simples, considerando a fluorescência do grupo controle (PCL) no período de análise de 1 dia como 100%.

4.2 Estudo 2 – Potencial Bioativo de *Scaffolds* de Nanofibras Contendo Cálcio e Impregnados com Fibronectina

Scaffolds de nanofibras de PCL incorporados com 0,4% hidróxido de cálcio foram selecionados para a condução da segunda fase (Estudo 2), uma vez que essa concentração de HC apresentou as melhores propriedades biológicas.

4.2.1 Preparação dos *scaffolds* de nanofibras impregnados com fibronectina

A confecção de *scaffolds* de nanofibras à base de PCL incorporados ou não com 0,4% hidróxido de cálcio (HC) foi realizada de acordo com os passos descritos no Estudo 1. Após obtenção dos *scaffolds* e realização do protocolo de lavagem/esterilização, estes foram imersos em 80 µL de solução de PBS contendo ou não 20 µg/mL⁷⁶ de fibronectina do plasma bovino (FN; Sigma-Aldrich), seguido de centrifugação a 1500 rpm, a 4 °C, por 10 minutos e mantidos por 12 h a 4 °C. Os grupos experimentais estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2- Grupos experimentais da segunda fase do projeto (Estudo 2).

Grupos	Concentração de cálcio	Concentração de fibronectina
PCL	-	-
PCL+FN	-	20 µg/mL
PCL+HC	0,4%	-
PCL+HC+FN	0,4%	20 µg/mL

PCL = Policaprolactona; HC = Hidróxido de cálcio; FN = Fibronectina

Fonte: Elaboração própria.

Para verificação da presença de fibronectina na estrutura do *scaffold* pelo método de fluorescência, amostras de cada grupo experimental (n=4) foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min, lavadas duas vezes com PBS e incubadas com BSA 1% para bloquear ligantes inespecíficos. A seguir os *scaffolds* foram incubados com anticorpo primário anti-fibronectina (Sigma-Aldrich) diluído em BSA 1%, seguido de incubação com o anticorpo secundário conjugado ao FITC³⁷. Por fim, as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B; 494 nm de excitação e 517 nm de emissão).

4.2.2 Avaliação biológica

O potencial bioativo dos *scaffolds* experimentais foi avaliado por meio dos seguintes ensaios: migração celular (*Transwell*), adesão e espalhamento celular (F-actina), viabilidade e proliferação celular (Live/Dead e alamarBlue), expressão gênica dos marcadores de diferenciação odontogênica (RT-qPCR), atividade de fosfatase alcalina (ALP; Timolftaleína) e formação de nódulos de mineralização (Alizarin red). Todos os ensaios citados foram realizados em dois momentos experimentais, para permitir observar reprodutibilidade. Os protocolos foram realizados conforme descrito a seguir.

4.2.2.1 Migração celular (n=4)

Para permitir adesão inicial das células, insertos de membrana de poliestireno (poros de 8 μm ; Trans-well, Corning) foram pré-aquecidos a 37 °C. HDPCs foram semeadas (3×10^4) sobre os insertos e incubadas por 2 h a 37 °C e 5% CO_2 ²¹. Em seguida, a superfície inferior dos insertos foi posicionada em íntimo contato com os *scaffolds* previamente inseridos nos compartimentos de placas de cultura de 24 compartimentos, contendo 1 mL meio α -MEM com 10% de SFB. Decorridas 24 h de incubação, os insertos e *scaffolds* foram fixados em paraformaldeído 4%, seguido de permeabilização com 0,1% Triton X-100 e incubação com sonda fluorescente em vermelho para filamentos de actina (1:20; reagente ActinRed 555, ReadyProbes, Invitrogen; 540 nm excitação e 565 nm emissão) em BSA 2%. Para detecção do núcleo foi utilizado o Hoechst 33342 (1:5000 em PBS; Invitrogen; 361 nm de excitação e 497 nm de emissão). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B). Imagens dos insertos (superfícies superior e inferior) e *scaffolds* (superfície superior) foram obtidas em 10 $\times$ de aumento para análise da capacidade migratória das células para a superfície dos *scaffolds*. Para análise quantitativa, foi realizada a contagem do número de células na superfície inferior do inserto por meio de imagens obtidas de 4 campos da amostra, totalizando 16 imagens por grupo, utilizando-se o programa Image J (NIH, National Institute of Health, EUA).

4.2.2.2 Adesão e espalhamento celular (n=4)

A análise da adesão e espalhamento celular foi realizada por teste de fluorescência após 1, 3 e 7 dias em cultura de acordo com o descrito no item 4.1.6.1 (página 35).

4.2.2.3 Viabilidade e proliferação celular

As análises de viabilidade e proliferação celular foram realizadas por meio dos testes de Live/Dead (n=4) e alamarBlue (n=8), após 1, 7 e 14 dias em cultura, de acordo com o item 4.1.6.2 (página 36).

4.2.2.4 Expressão gênica dos marcadores de diferenciação odontogênica (n=6)

A expressão gênica (Quadro 3) foi avaliada por meio de PCR em tempo real após 21 dias. Para tanto, HDPCs foram semeadas na superfície dos *scaffolds* e cultivadas com meio de diferenciação suplementado com 5 mM de β -glicerofosfato (Santa Cruz Biotechnology) e 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Fisher Chemical, NJ, EUA) por 21 dias. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e os *scaffolds* lavados uma vez com PBS. O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído imediatamente usando 300 μ L de solução de tiocianato de guanidínio e purificado em um sistema de colunas de afinidade, incluindo tratamento com DNase I, seguindo os protocolos do fabricante (RNAqueous Micro Total Isolation Kit; Invitrogen). Após purificação, a quantidade total e a pureza do material genético foram verificadas por espectrofotometria e valores de densidade óptica relativa 260/280 entre 1,9 e 2,1 foram considerados adequados (BioTek Take3 Application/Sinergy H1). A transcrição reversa em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada com 800 ng de RNA utilizando *primers* randômicos e transcriptase reversa *MultiScribe*, seguindo as recomendações do fabricante (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems by Thermo Scientific, Foster City, CA, EUA). As reações em cadeia da polimerase foram realizadas pelo método quantitativo (qPCR) utilizando 1 μ L de cDNA e ensaios com concentrações otimizadas de *primers* e sondas de hidrólise (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) para amplificação dos genes descritos no Quadro 3. As reações foram conduzidas no sistema StepOnePlus (Applied Biosystems) seguindo as condições de termociclagem otimizada pelo fabricante dos ensaios e master mix (TaqMan Fast Advanced Master Mix; Applied

Biosystems): incubação de Uracil-DNA glicosilase a 50 °C por 2 minutos, ativação da DNA polimerase a 95 °C por 2 minutos, e 40 a 45 ciclos de qPCR cada um com desnaturação a 95 °C por 1 segundo e anelamento a 60 °C por 20 segundos.

A expressão gênica foi calculada pelo método do ciclo de quantificação (Cq) comparativo ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) utilizando a expressão do gene de referência (GAPDH) sendo apresentada relativa (*Fold change*) ao grupo controle (PCL).

Quadro 3- Ensaios TaqMan (Applied Biosystems) para determinação da diferenciação celular com fenótipo odontoblástico.

Gene	Assay ID	Proteína Codificada
DMP1	Hs01009391_g1	Proteína da matriz dentinária 1
DSPP	Hs00171962_m1	Sialofosfoproteína dentinária
ALPL	Hs01029144_m1	Fosfatase alcalina
COL1A1	Hs01076756_g1	Colágeno tipo 1
GAPDH	Hs02786624_g1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (constitutiva)

Fonte: Elaboração própria.

4.2.2.5 Atividade de fosfatase alcalina (n=8)

HDPCs foram cultivadas (5×10^4) sobre os *scaffolds* e os conjuntos *scaffold*-células mantidos em meio de diferenciação por 14 dias. Após esse período, uma solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich) foi aplicada sobre as células a fim de promover a lise celular. Para determinação da atividade de fosfatase alcalina, dois parâmetros foram avaliados: a dosagem de fosfatase alcalina e a dosagem de proteína total. Para a dosagem de fosfatase alcalina uma alíquota de 100 µL da solução de lise foi transferida para tubos contendo timolftaleína monofosfato (22 mmol/L) a 37°C. Em seguida, um reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L) foi adicionado, sendo a absorbância mensurada a 590 nm, seguindo o protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest).

Para a dosagem de proteína total, uma alíquota de 100 µL da solução de lise foi transferida para tubos contendo solução de Lowry (Sigma-Aldrich), a qual ficou em contato por 20 minutos a 25°C. Em seguida, a solução de Folin e Ciocalteu's Phenol

Reagent (Sigma-Aldrich) foi adicionada, permanecendo em contato por 30 minutos. Após 30 minutos, a concentração de proteínas e/ou fragmentos de proteína presente em cada amostra foi determinada em espectrofotômetro a 655 nm (Synergy H1). Os valores das dosagens de fosfatase alcalina e proteína total foram plotados em curva padrão (0,00 - 0,25 U/L para ALP; 0 – 40 µg/mL para proteína total). O valor da atividade de fosfatase alcalina foi obtido a partir da divisão do valor de sua dosagem pelo valor da dosagem de proteína total e os resultados foram apresentados em U/µg.

4.2.2.6 Formação de nódulos de mineralização (n=8)

HDPCs foram cultivadas (5×10^4) sobre os *scaffolds* em mantidos em meio de diferenciação durante 21 dias. Em seguida, foram fixadas com etanol 70% a 4 °C e coradas com solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4.2; Sigma-Aldrich). Após lavagem com água deionizada, foram obtidas imagens, por meio de uma câmera fotográfica, da superfície dos *scaffolds* para avaliação qualitativa. Então, os nódulos foram dissolvidos pela aplicação de solução de cloreto de cetilpiridíneo em PBS (10%, pH 7.0; Sigma-Aldrich), sendo a absorbância da solução resultante lida em espectrofotômetro (Synergy H1) a 560 nm. A normalização dos valores de absorbância foi feita com *scaffolds* sem células mantidos em cultura pelo mesmo período experimental. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem pela aplicação de uma regra de três simples, considerando a absorbância do grupo controle (PCL) como 100%.

4.3 Análise Estatística

Os dados do diâmetro das nanofibras, espaços interfibrilares, viabilidade celular, migração celular, expressão genica, atividade de ALP e formação de matriz mineralizada foram inferidos por testes de hipóteses realizados no software SPSS versão 20.0 (IBM Inc., Chicago, IL, EUA). Primeiramente foi avaliada a aderência dos dados a curva normal (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). Após a confirmação de distribuição normal as hipóteses foram testadas por análise de variância (ANOVA) a um fator (“grupo”), e as múltiplas comparações foram realizadas pelo pós-teste de Tukey ou Games-Howell, de acordo com a homocedasticidade dos grupos. A viabilidade celular foi avaliada por ANOVA a dois fatores (“grupo” e “período de análise”) com uma medida repetida. Uma vez que não houve efeito da interação

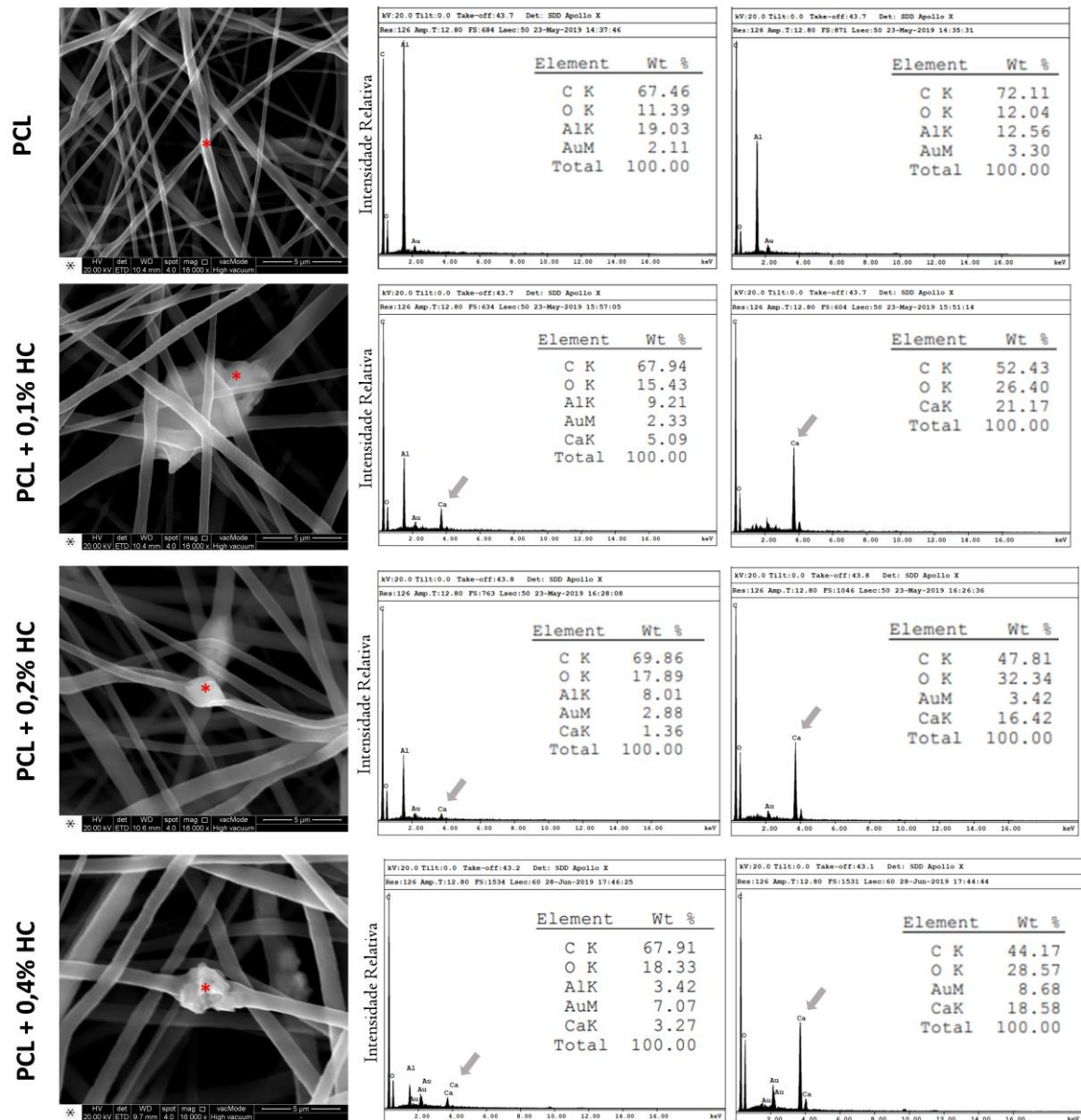
dos fatores, o efeito principal de cada fator foi analisado por ANOVA a um fator, seguido do teste de Sidak para as múltiplas comparações. O nível de significância adotado para todas as inferências foi de 5%. Os dados das variáveis perda de massa, alteração do pH e liberação de cálcio foram inferidos por média com intervalos de confiança (IC=95%). As imagens de fluorescência referentes a viabilidade, adesão, espalhamento celular e impregnação de fibronectina à estrutura do *scaffold* foram avaliadas qualitativamente.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do Estudo 1

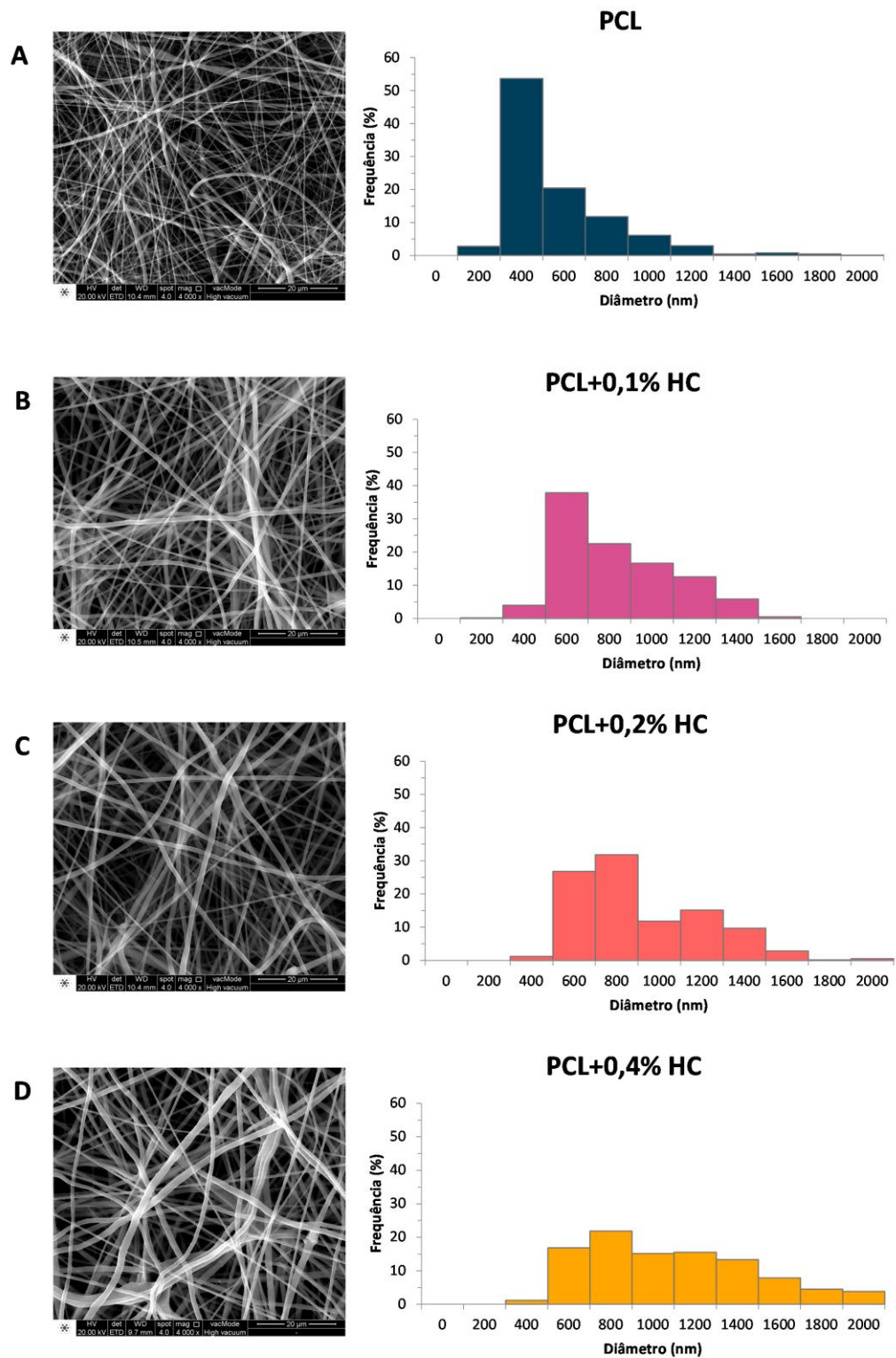
A incorporação de hidróxido de cálcio nas nanofibras poliméricas foi confirmada por EDS (Figura 4). Foram formados nódulos ao longo das nanofibras, facilmente identificados nas fotomicrografias de MEV em 16.000 $\times$, correspondentes à picos de concentração de cálcio (Figura 4). Nas imagens de MEV obtidas no aumento de 4000 $\times$, observa-se a formação de nanofibras com direções aleatórias e aumento do diâmetro das nanofibras com o do aumento da concentração de HC incorporado ao polímero, confirmado pela frequência da distribuição desses diâmetros (Figura 5). No grupo PCL (controle), a maioria das nanofibras apresentou diâmetro de 400 nm, com aumento para 600 nm quando há a incorporação de 0,1% e 800 nm quando da incorporação 0,2% ou 0,4% de HC (Figura 5). Em comparação ao controle, houve diferença no diâmetro das nanofibras para todas as formulações onde houve a incorporação de HC ($F=212,212$; $p<0,001$; ANOVA; Figura 6A) e a formulação de 0,4% HC resultou em maior diâmetro, diferindo estatisticamente das demais concentrações ($p<0,001$; Tukey). Apesar das diferenças encontradas para o diâmetro, não houve influência da presença de HC, independentemente da concentração, na porcentagem de espaços interfibrilares ($F=2,654$; $p=0,06$; ANOVA; Figura 6B).

Figura 4- Painel de MEV e EDS. Da esquerda para a direita: Imagens de MEV da superfície dos *scaffolds* em aumento de 16.000×; respectivos espectrogramas gerados por EDS de toda a área da imagem; e EDS do ponto indicado pelo asterisco na imagem. Setas indicam a detecção de picos compatíveis com cálcio (Ca) incorporado ao polímero PCL (indicado pelos espectros compatíveis com os elementos C e O). A detecção dos elementos Al e Au correspondem, respectivamente, à folha de alumínio sobre a qual as nanofibras foram sintetizadas e o ouro do processo de metalização das amostras para análise em MEV.



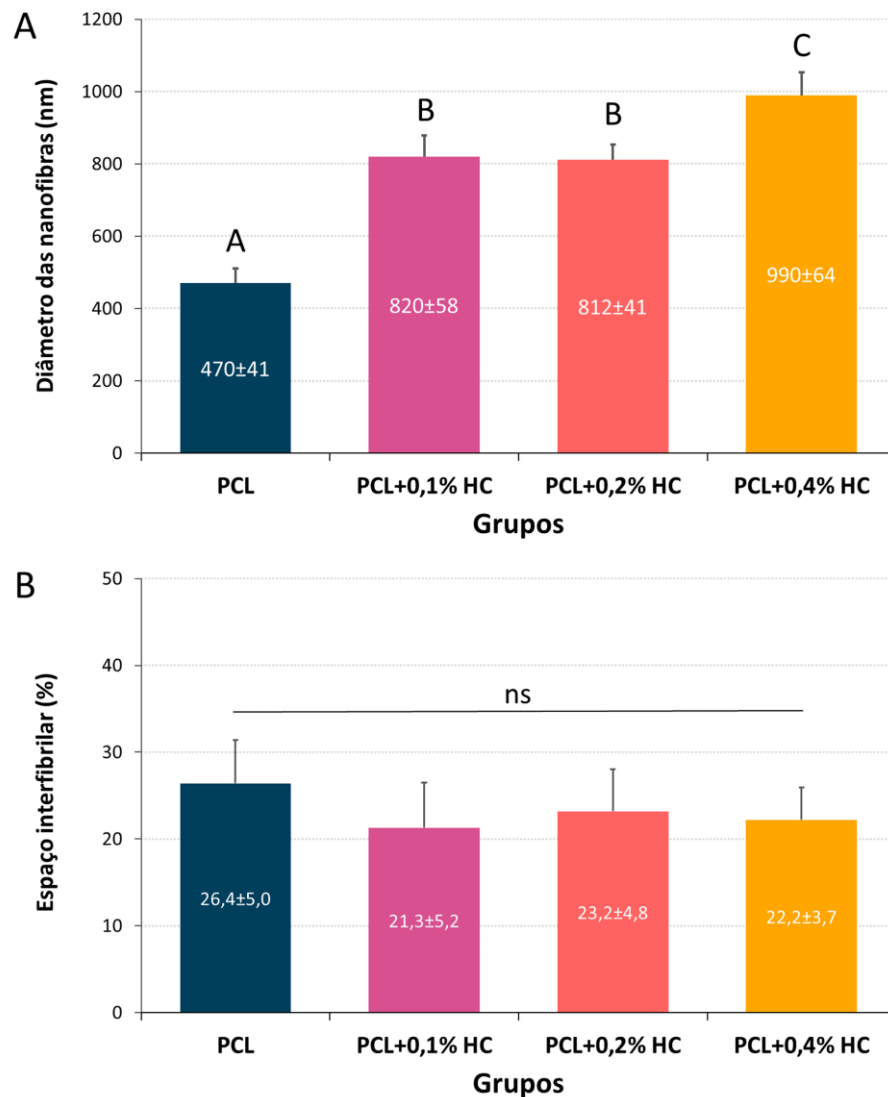
Fonte: Elaboração própria.

Figura 5- Imagens em MEV da superfície dos *scaffolds* em aumento de 4000× e correspondente gráfico de distribuição de frequências (%) de diâmetro das nanofibras (n=600). **(A)** PCL (controle); **(B)** PCL+0,1% HC; **(C)** PCL + 0,2% HC; **(D)** PCL + 0,4% HC.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6- Gráficos de barras representando **(A)** Diâmetro das nanofibras e **(B)** porcentagem de espaços interfibrilares. Colunas representam médias e barras de erro indicam os desvios-padrão. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (ANOVA e Tukey, $\alpha=5\%$, $n=12$). ns = ausência de significância estatística entre os grupos.

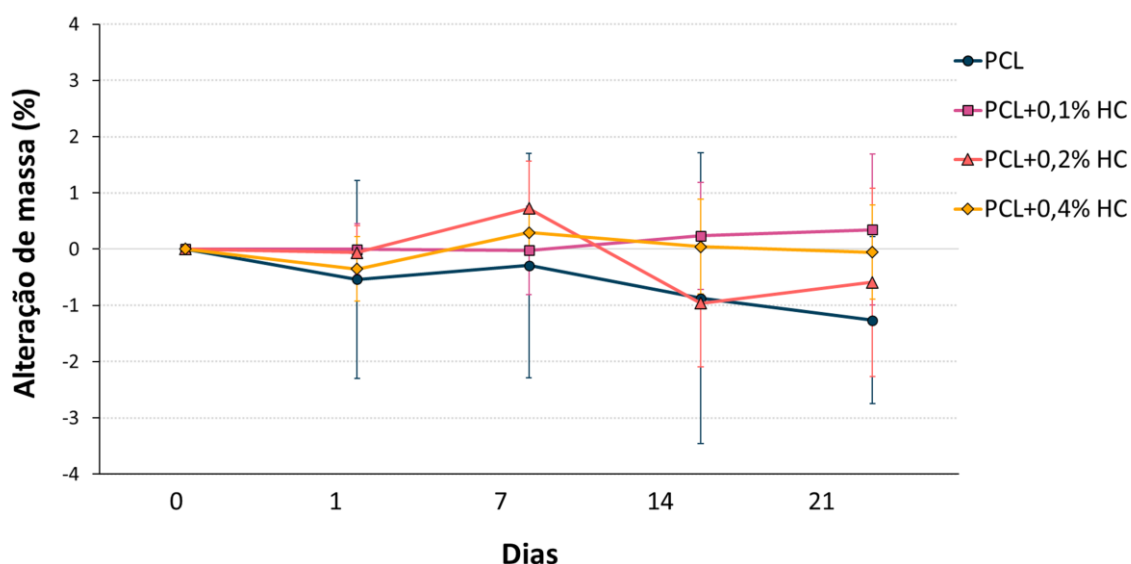


Fonte: Elaboração própria.

O ensaio de degradação hidrolítica demonstrou um padrão de perda de massa lento, sem diferença significativa entre os grupos nos períodos avaliados (Figura 7). Por outro lado, os dados de liberação de cálcio mostraram uma liberação maior e mais duradoura proporcionalmente a concentração inicial de hidróxido de cálcio incorporada a estrutura dos *scaffolds* (Figura 8A). O pico de liberação ocorreu no primeiro dia para todas as formulações, com valor máximo de $2,20\pm0,19$ mM no grupo

0,4% HC. A mesma concentração foi capaz de manter a liberação significativa até o sétimo dia, enquanto as concentrações de 0,1% e 0,2% HC, mantiveram a liberação significativa apenas até o primeiro e o terceiro dia, respectivamente. O pH diferiu estatisticamente do grupo controle (PCL) apenas para o grupo 0,4% HC no período de 1 dia ($7,6 \pm 0,1$), todos os grupos apresentaram pH médio na faixa de neutralidade (6,9-7,9), independente do período de análise (Figura 8B).

Figura 7- Gráfico de linhas representando alteração de massa dos *scaffolds* armazenados em água por até 21 dias. Pontos representam valores médios de porcentagem de perda ou ganho em relação a massa inicial e barras de erro indicam os intervalos de confiança (IC 95%).

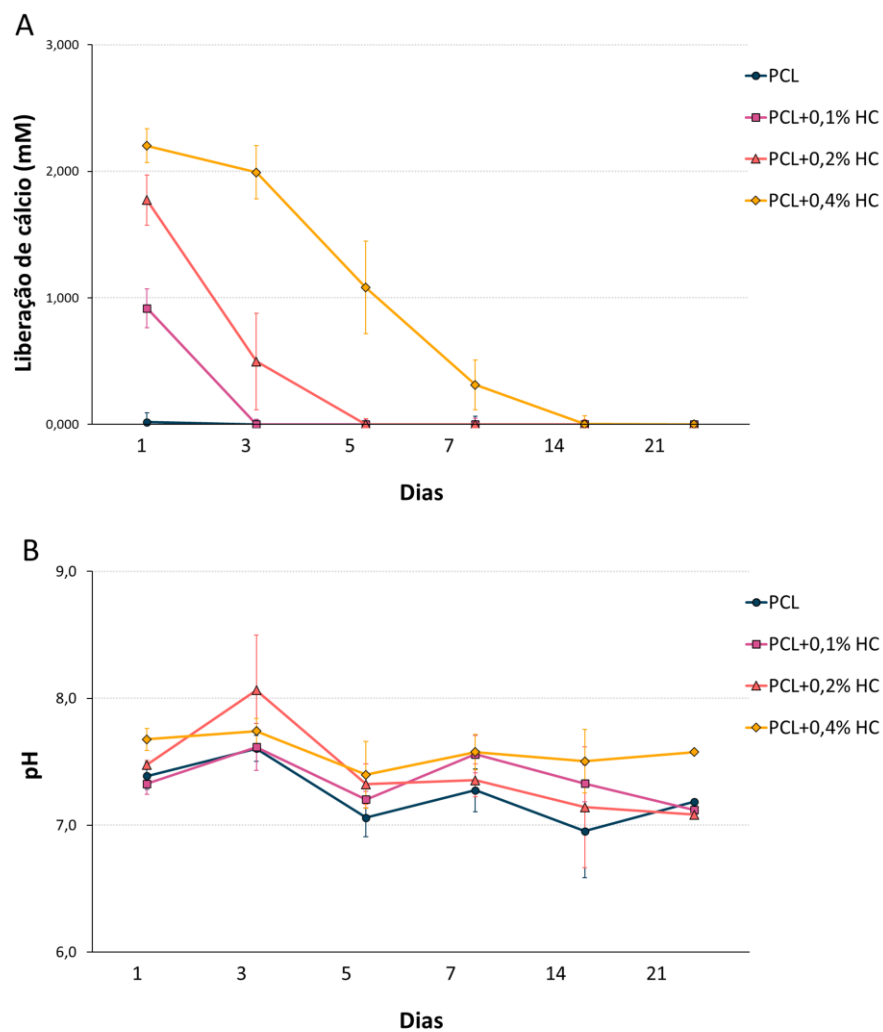


Fonte: Elaboração própria.

As imagens de fluorescência direta obtidas pelo ensaio de adesão e espalhamento celular (Figura 9) mostraram uma melhor adesão em todos os períodos de análise para os grupos das diferentes formulações de *scaffolds*, com superfície nanofibrilar, quando comparado com a superfície plana do grupo “Lamínula”. No período de análise mais tardio (7 dias) é possível observar um melhor espalhamento celular para as todas as formulações dos *scaffolds*, intensificada quando da incorporação de 0,4% HC. As imagens de fluorescência direta (Figura 10) obtidas pelo

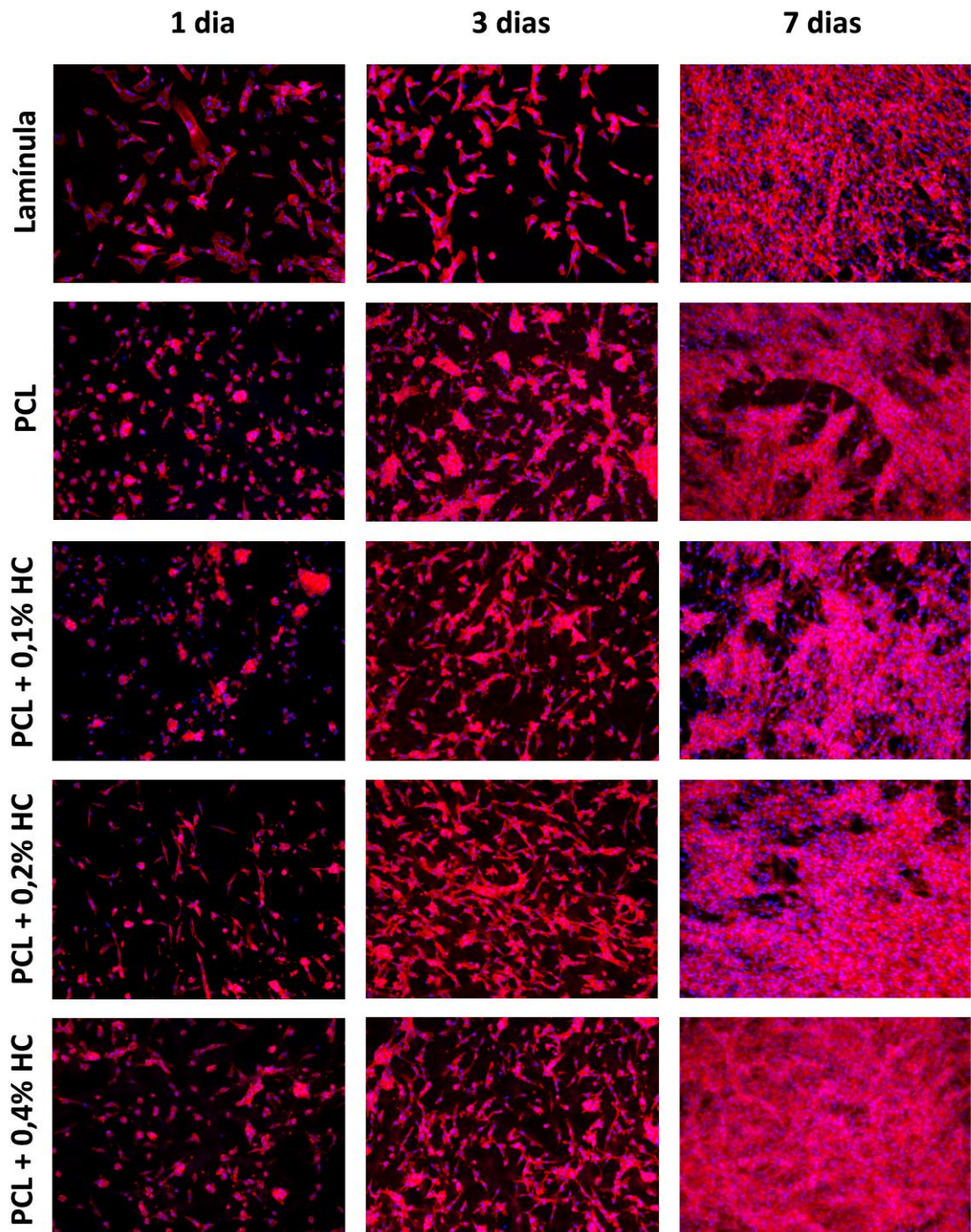
teste de Live/Dead mostraram um aumento da quantidade de células viáveis para todas as formulações nos períodos avaliados (1, 7 e 14 dias) com pequena quantidade de células mortas.

Figura 8- Gráficos de linhas representando **(A)** Liberação de cálcio e **(B)** alteração de pH do meio de armazenamento dos *scaffolds*. Pontos representam valores médios de porcentagem de massa em relação a massa inicial e barras de erro indicam os intervalos de confiança (IC 95%).



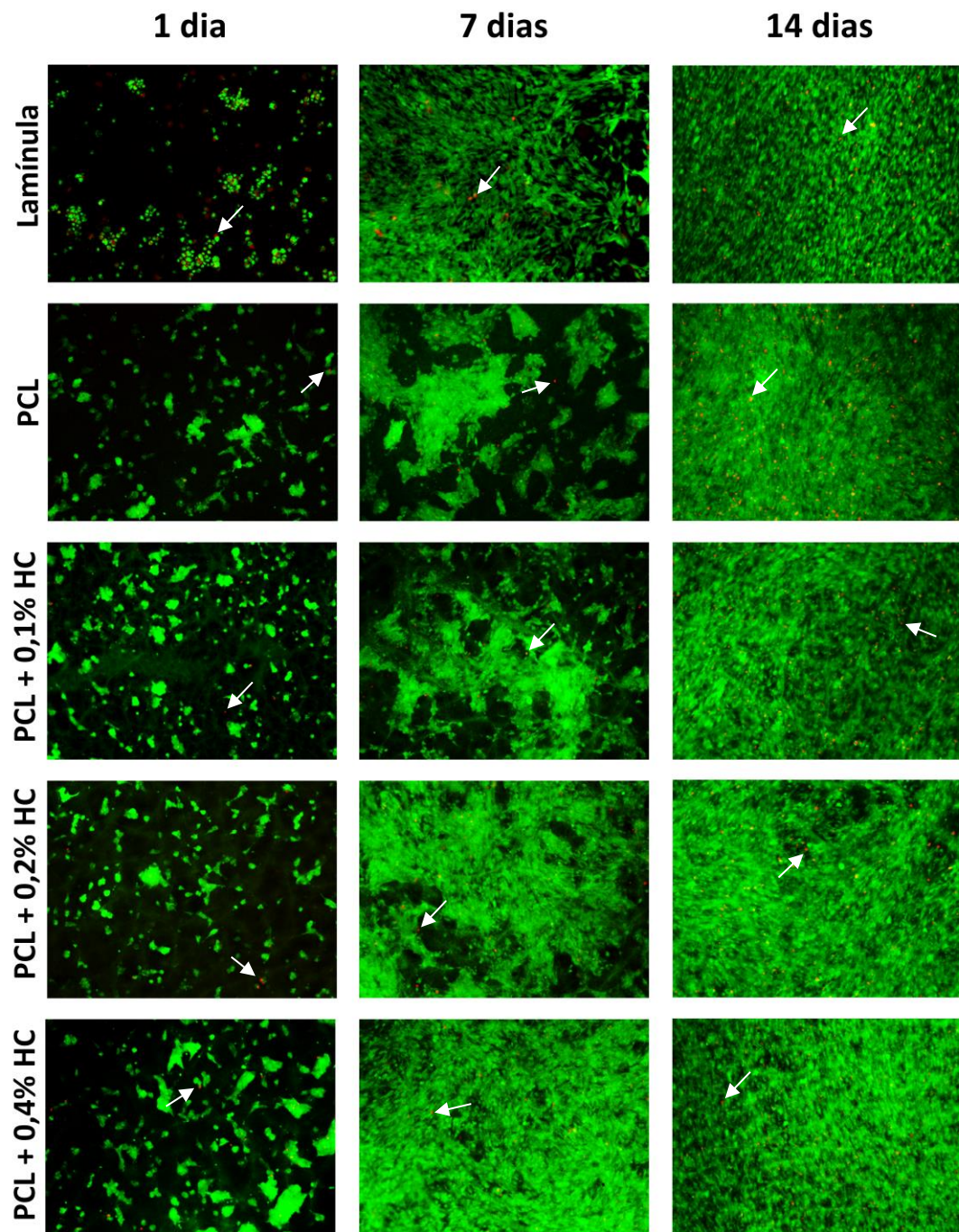
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9- Pannel de imagens (10×) representativas de fluorescência direta do ensaio de adesão e espalhamento celular (F-actina). Da esquerda para a direita: 1, 3 e 7 dias de cultivo de HDPCs sobre a superfície dos *scaffolds*. Fluorescência vermelha (ActinRed) indica a marcação dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto, enquanto a fluorescência azul (Hoechst) indica a marcação do núcleo celular.



Fonte: Elaboração própria.

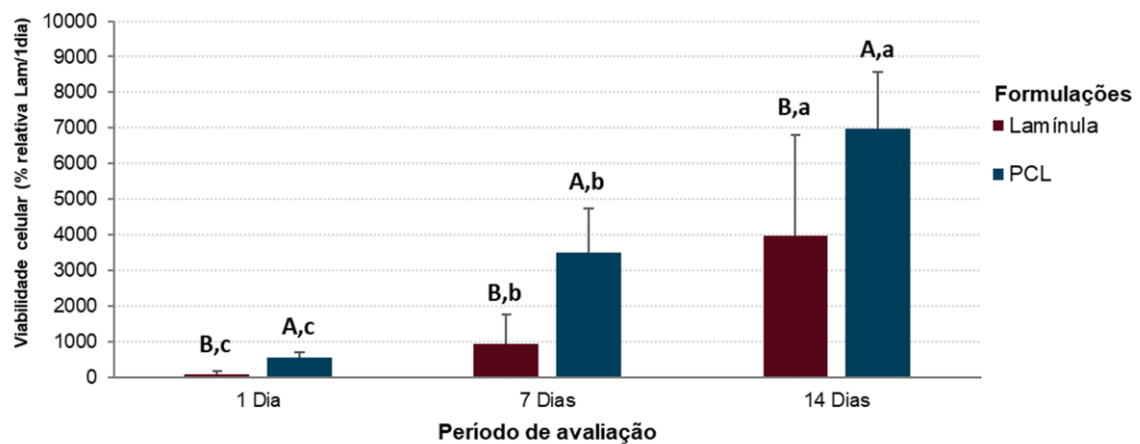
Figura 10- Paineis de imagens (10×) representativas de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (*Live/Dead*). Da esquerda para a direita: 1, 7 e 14 dias de cultivo de HDPCs sobre a superfície dos *scaffolds*. Fluorescência verde (calceína) indica a presença de células viáveis e fluorescência vermelha (homodímero de etídio) indica presença de células em processo de morte.



Fonte: Elaboração própria.

Ao avaliar a viabilidade celular segundo o ensaio de alamarBlue, primeiramente foi realizada a comparação entre o grupo “Lamínula” e “PCL” com ANOVA a dois fatores com uma medida repetida, assim, foi possível verificar efeito do fator grupo ($F=10,012$; $p=0,016$) e do fator período ($F=84,158$; $p<0,001$), não havendo interação entre os fatores ($F=4,149$; $p=0,072$), mostrando maior viabilidade para o grupo com superfície nanofibrilar independente do período (Figura 11) e aumento do metabolismo celular ao longo do tempo para os dois grupos nos períodos avaliados.

Figura 11- Gráfico de barras representando a viabilidade de HDPCs (porcentagem relativa ao grupo “Lamínula” 1 dia de cultivo). Colunas representam valores médios da porcentagem de viabilidade celular e barras de erro indicam os desvios-padrão. Letras maiúsculas comparam o efeito principal do fator “grupo” e letras minúsculas do fator “período”. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$; $n=8$; ANOVA a dois fatores com uma medida repetida e pós teste de Sidak, $\alpha=5\%$).

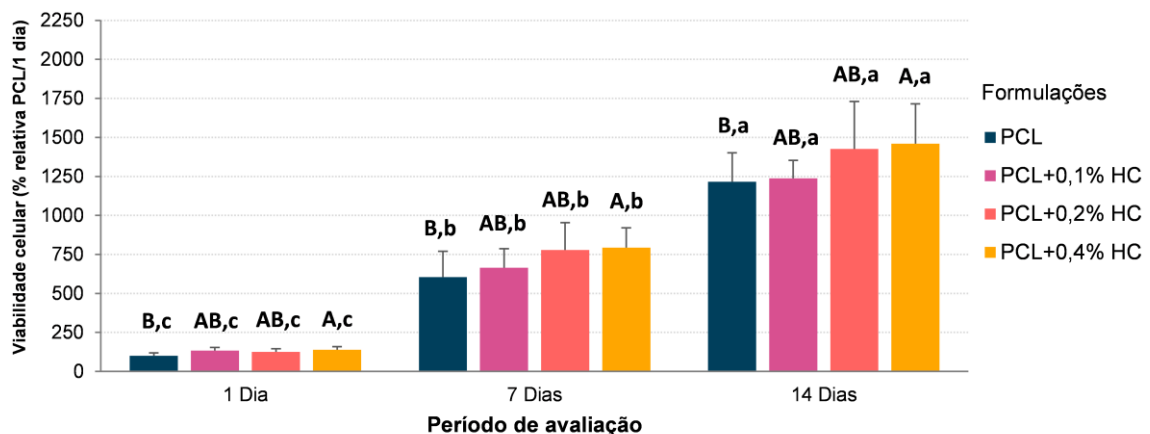


Fonte: Elaboração própria.

Após a validação interna da citocompatibilidade do biomaterial avaliado, foi realizada a comparação dos *scaffolds* nas diferentes formulações (Figura 11). Efeito semelhante a comparação com o grupo “Lamínula” foi encontrado, podendo observar efeito dos fatores grupo (ANOVA a dois fatores com uma medida repetida; $F=4,033$; $p=0,021$) e período ($F=347,296$; $p<0,001$) sem efeito da interação dos fatores ($F=1,687$; $p=0,210$). Houve aumento significativo do metabolismo celular ao longo do

tempo para todas as formulações de *scaffolds* nos 3 períodos avaliados ($p \leq 0,001$; Sidak; Figura 12). Ao avaliar o efeito do grupo (4 níveis) nota-se diferença significativa do grupo controle (PCL) apenas para a formulação de 0,4% HC ($p = 0,025$; Sidak), independente do período avaliado, o qual se assemelha as demais concentrações contendo a adição da fase mineral ($p \geq 0,142$; Sidak).

Figura 12-. Gráfico de barras representando a viabilidade de HDPCs dos *scaffolds* (porcentagem relativa ao grupo “PCL” em 1 dia de cultivo). Colunas representam valores médios da porcentagem de viabilidade celular e barras de erro indicam os desvios-padrão. Letras maiúsculas comparam o efeito principal do fator “grupo” e letras minúsculas do fator “período”. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$; $n = 8$; ANOVA a dois fatores com uma medida repetida e pós teste de Sidak, $\alpha = 5\%$).

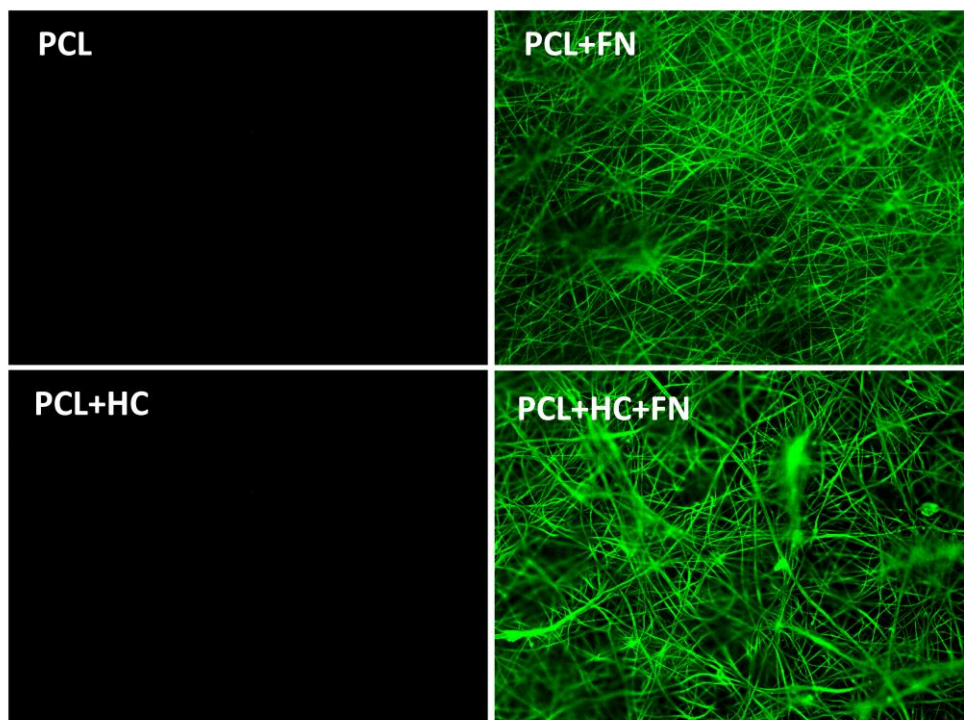


Fonte: Elaboração própria.

5.2 Resultados do Estudo 2

As imagens obtidas por imunofluorescência demonstraram a incorporação uniforme de fibronectina por toda a superfície nanofibrilar dos *scaffolds*, independente da formulação conter ou não hidróxido de cálcio (Figura 13).

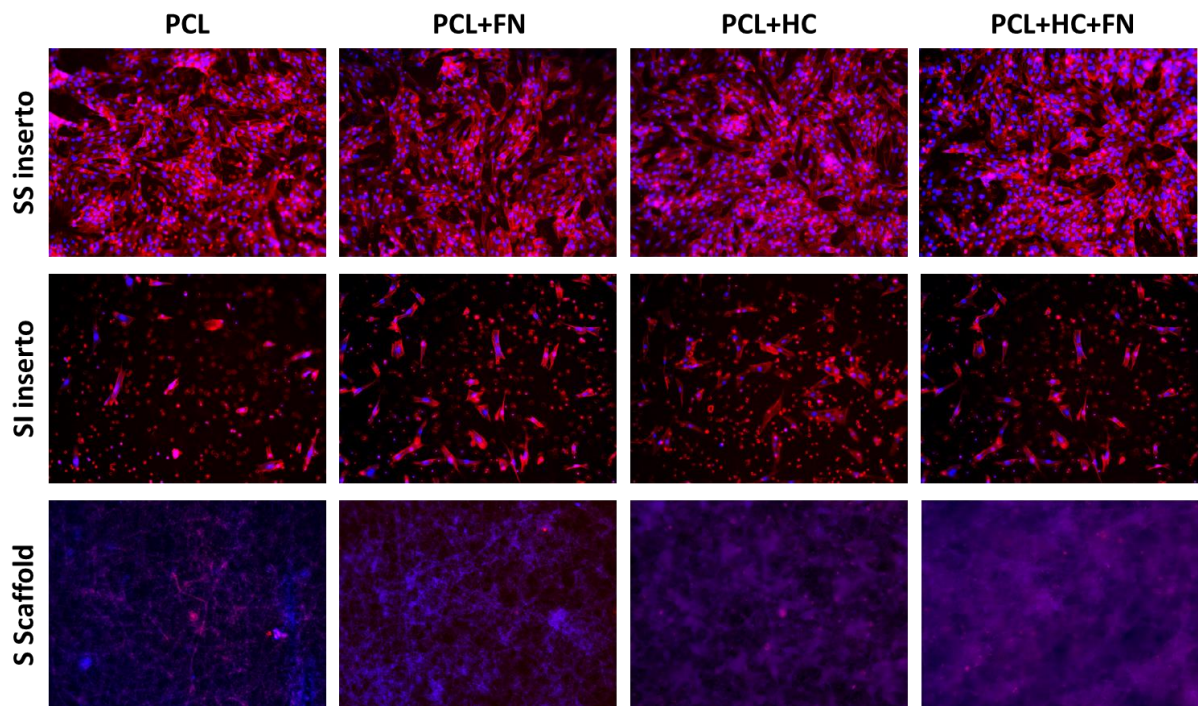
Figura 13- Painel de imagens (20×) representativas de imunofluorescência. Imagens da impregnação de fibronectina (FN) aos scaffolds contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL). Fluorescência verde indica a presença de fibronectina.



Fonte: Elaboração própria.

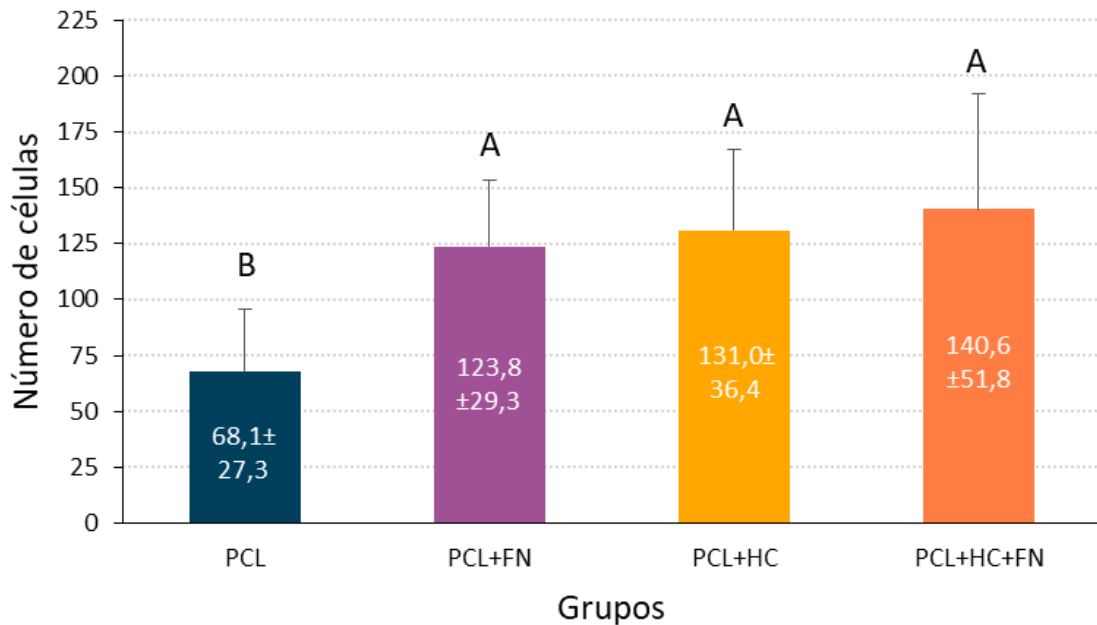
A análise qualitativa do ensaio de migração celular demonstrou a capacidade das células de ultrapassarem de maneira ativa os poros do inserto, devido a presença de células nas imagens obtidas da superfície inferior, porém não foram encontradas células na superfície dos *scaffolds* para nenhum grupo no período avaliado (Figura 14). Já a análise quantitativa apresentou diferença na quantidade de células na superfície inferior do inserto ($F=16,44$; $p<0,001$; ANOVA de Welch, Figura 15), mostrando maior migração celular em todos os grupos experimentais quando comparados ao controle (PCL; $p<0,001$; Games-Howell), sem diferenças significativas entre si ($p\geq 0,588$).

Figura 14- Painel de imagens (10×) representativas de fluorescência direta do ensaio de migração celular. De cima para baixo: Superfície superior do inserto (SS Inserto), superfície inferior do inserto (SI Inserto) e superfície do *scaffold* (S Scaffold), contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL), após 24 horas de cultivo de HDPCs sobre a superfície superior do inserto. Fluorescência vermelha indica a marcação dos filamentos de actina (ActinRed) presentes no citoesqueleto, enquanto a fluorescência azul indica a marcação do núcleo celular (Hoechst).



Fonte: Elaboração própria.

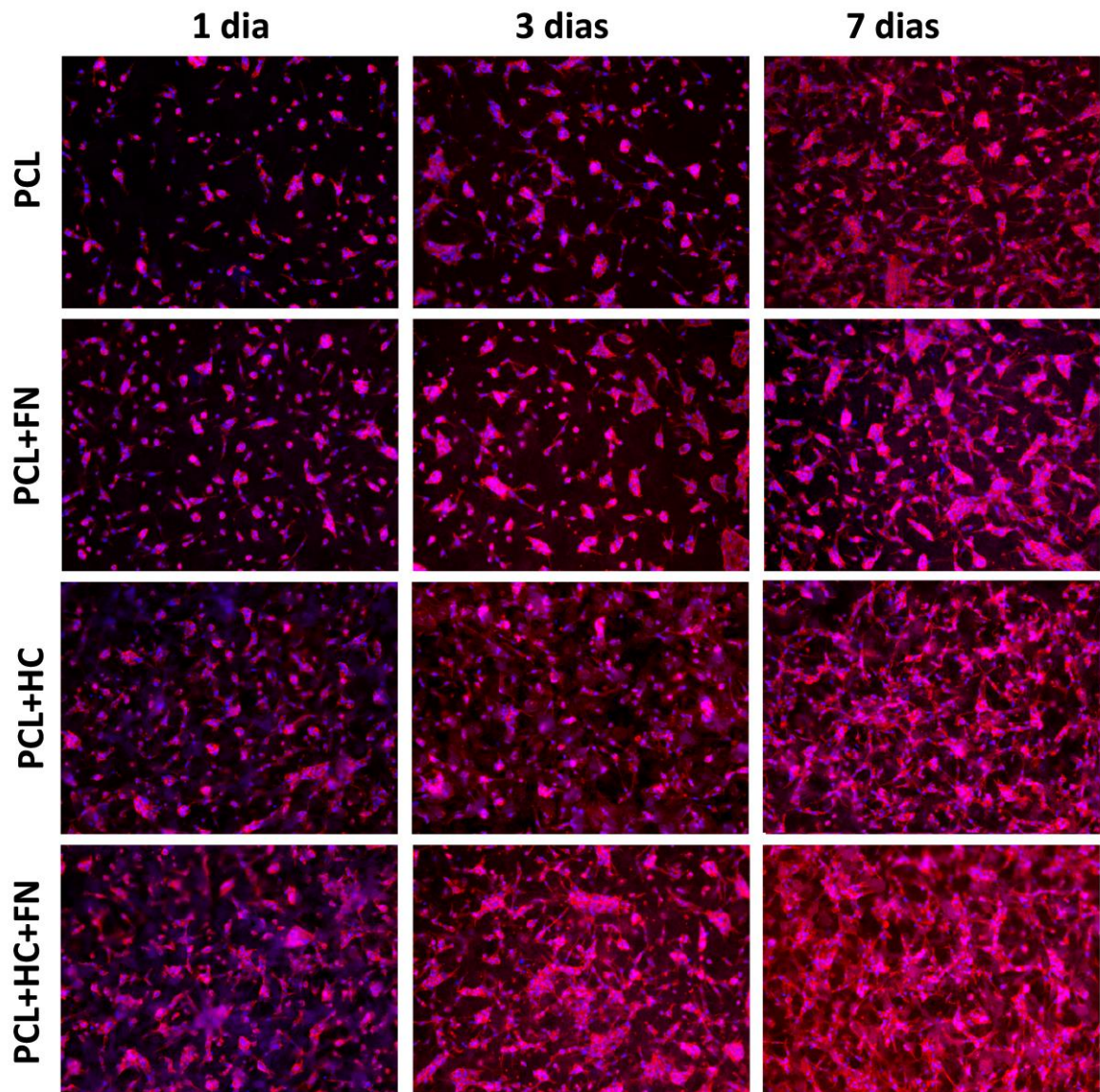
Figura 15- Gráfico de barras representando migração celular. Número de células na superfície inferior do inserto após 24 horas do cultivo de HDPCs em contato com os *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL). Colunas representam valores médios do número de células e barras de erro indicam os desvios-padrão. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (ANOVA de Welch e Games Howell, $\alpha=5\%$, $n=16$).



Fonte: Elaboração própria.

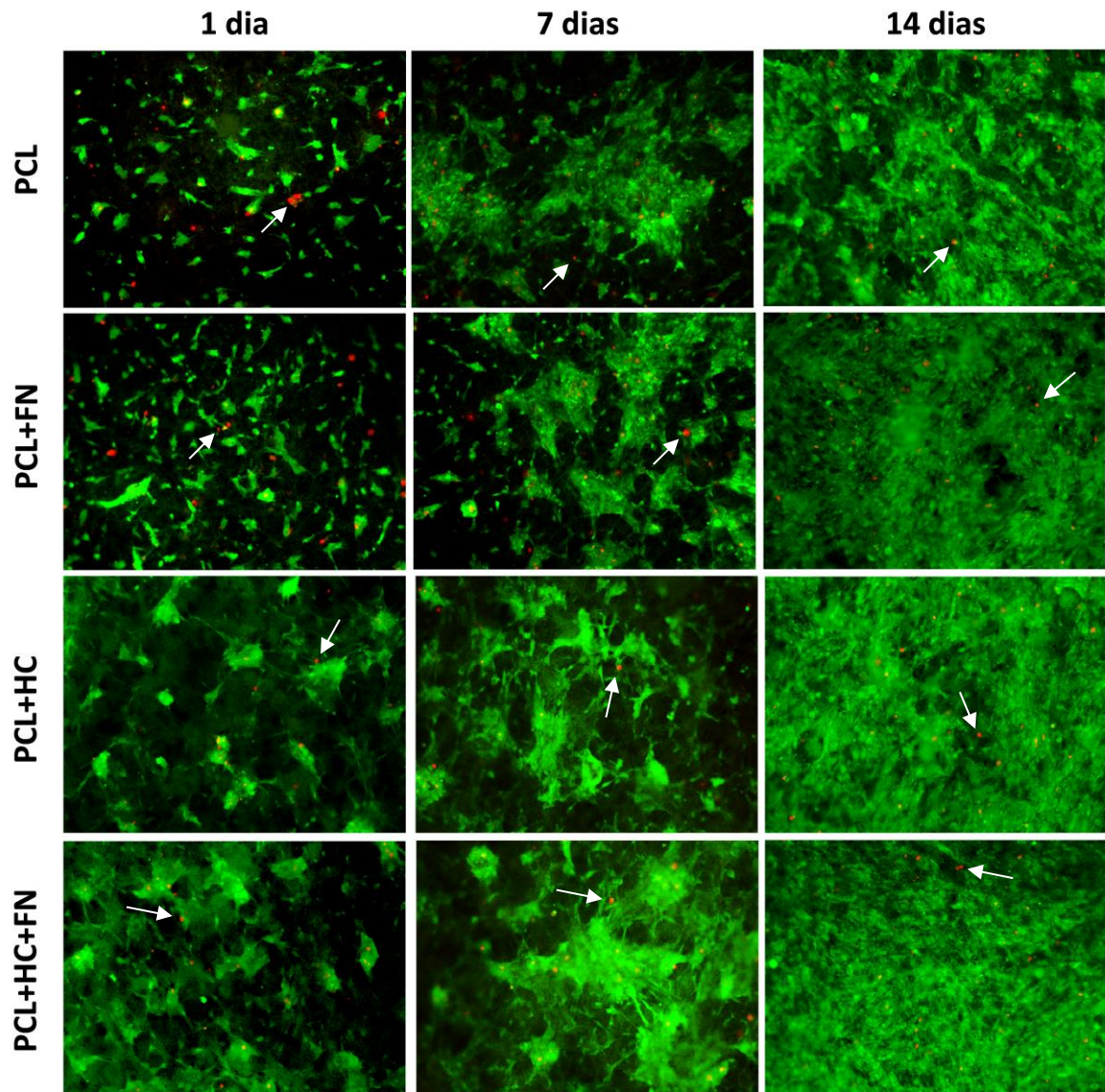
A adesão e espalhamento de HDPCs sobre os *scaffolds*, observada nas imagens de fluorescência direta, foi uniforme para todos os grupos nos períodos avaliados. A presença de HC promoveu aumento do espalhamento celular a partir do terceiro dia de cultura, o qual foi intensificado quando da presença conjunta de fibronectina no período mais tardio de análise (Figura 16). Grande número de células viáveis e poucas células em processo de morte foi observado para todos os grupos, com aumento expressivo de células viáveis em função dos períodos de análise. No período de 1 dia, foi observada a formação de nódulos celulares para os *scaffolds* incorporados com HC, enquanto para os *scaffolds* sem essa fase mineral as células apresentavam-se mais isoladas (Figura 17).

Figura 16- Painel de imagens (10×) representativas de fluorescência direta do ensaio de adesão e espalhamento celular (F-actina). Da esquerda para a direita: 1, 3 e 7 dias de cultivo de HDPCs sobre a superfície dos *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL). Fluorescência vermelha indica a marcação dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto (ActinRed), enquanto a fluorescência azul indica a marcação do núcleo celular (Hoechst).



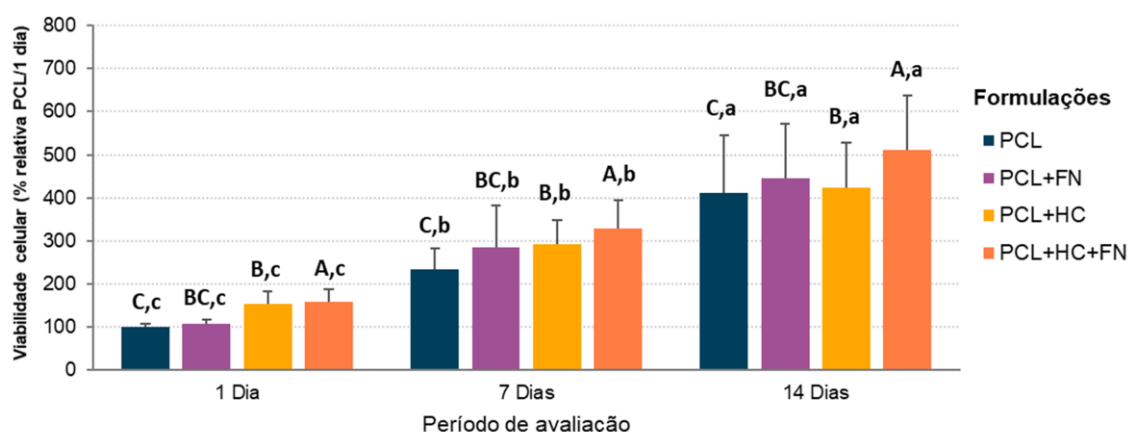
Fonte: Elaboração própria.

Figura 17- Paineis de imagens (10×) representativas de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/dead). Da esquerda para a direita: 1, 7 e 14 dias de cultivo de HDPCs sobre a superfície dos *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL). Fluorescência verde indica (calceína) a presença de células viáveis e fluorescência vermelha (homodímero de etídio) indica presença de células em processo de morte.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 18- Gráfico de barras representando a viabilidade de HDPCs semeadas sobre os *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL; porcentagem relativa ao grupo PCL em 1 dia de cultivo). Colunas representam valores médios da porcentagem de viabilidade celular e barras de erro indicam os desvios-padrão. Letras maiúsculas comparam o efeito principal do fator “grupo” e letras minúsculas do fator “período”. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$; $n = 8$; ANOVA a dois fatores com uma medida repetida e pós teste de Sidak, $\alpha = 5\%$).



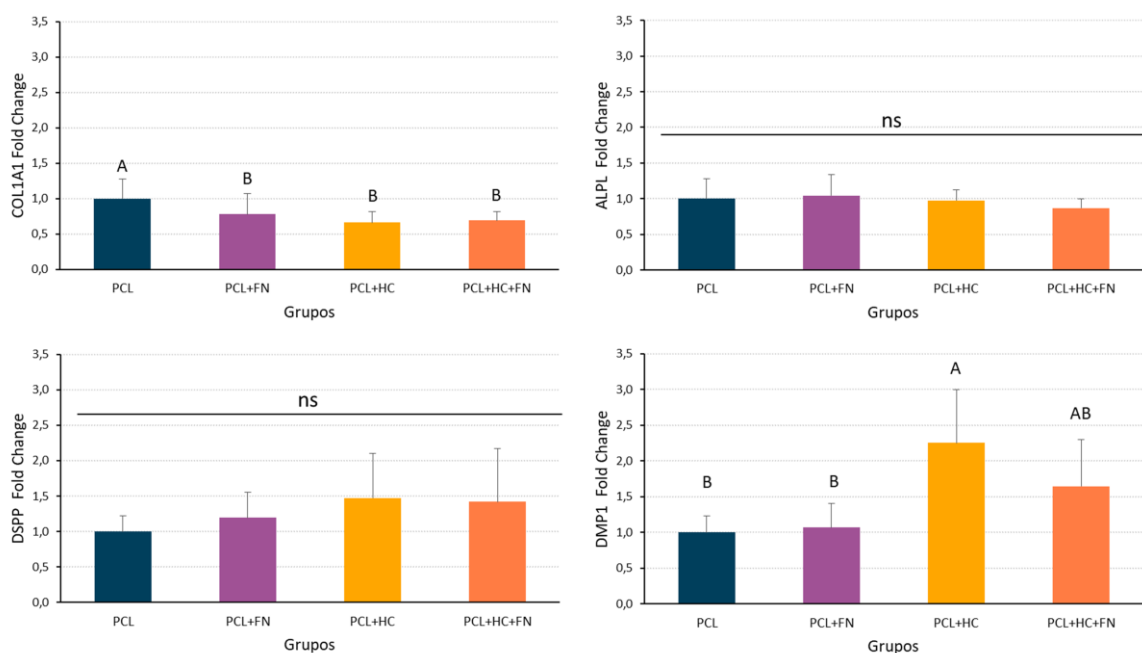
Fonte: Elaboração própria.

A análise quantitativa da viabilidade de HDPCs (Figura 18) demonstrou efeito dos fatores “grupo” (ANOVA a dois fatores com uma medida repetida; $F = 16,654$; $p < 0,001$) e “período” ($F = 48,103$; $p < 0,001$) sem efeito da interação dos fatores ($F = 1,115$; $p = 0,358$). Para o efeito do fator principal “grupo” pode-se observar o aumento do metabolismo celular na presença de HC incorporado aos *scaffolds* quando comparados ao controle ($p < 0,006$; Sidak). A adição de fibronectina ao PCL não resultou em diferença significativa do grupo controle ($p = 0,282$; Sidak). Por outro lado, a adição de fibronectina aos *scaffolds* contendo a fase mineral resultou na maior média de viabilidade celular, diferindo de todos os demais grupos ($p \leq 0,041$; Sidak), em todos os períodos de análise. Ao longo desses períodos, houve aumento significativo da viabilidade celular ($p \leq 0,003$; Sidak) (Figura 18).

A expressão gênica de marcadores de diferenciação odontogênica avaliada em 21 dias de cultura (Figura 19) demonstrou que a composição dos *scaffolds* não foi capaz de alterar a expressão dos genes ALPL (ANOVA $F = 0,693$; $p = 0,567$) e DSPP (ANOVA de Welch; $F = 1,004$; $p = 0,412$). Para o gene COL1A1 (ANOVA de Welch; $F = 24,938$; $p < 0,001$) todos os grupos experimentais apresentaram uma redução na

expressão quando comparados ao controle (Games-Howell; $p \leq 0,001$) não diferindo estatisticamente entre si ($p \geq 0,185$). Houve regulação da expressão para o gene DMP1 (ANOVA de Welch; $F=5,712$; $p=0,015$) no grupo onde foi incorporado aos *scaffolds* HC quando comparado ao controle (PCL; Games-Howell; $p=0,030$), causando aumento médio de $2,3\times$ na expressão. A adsorção de fibronectina a esses *scaffolds* com HC não foi capaz de alterar a expressão gênica de DMP1 (Games-Howell; $p=0,474$), também sem diferença significativa em relação ao controle (Games-Howell; $p=0,205$).

Figura 19- Gráficos de barras expressão de RNA mensageiro dos genes COL1A1, ALPL, DSPP e DMP1 por HDPCs cultivadas sobre os *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 $\mu\text{g/mL}$), por 21 dias de cultura. Colunas representam valores médios de Fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) e barras de erro indicam os desvios-padrão. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente (ANOVA e Tukey ou Games Howell, $\alpha=5\%$, $n=6$).

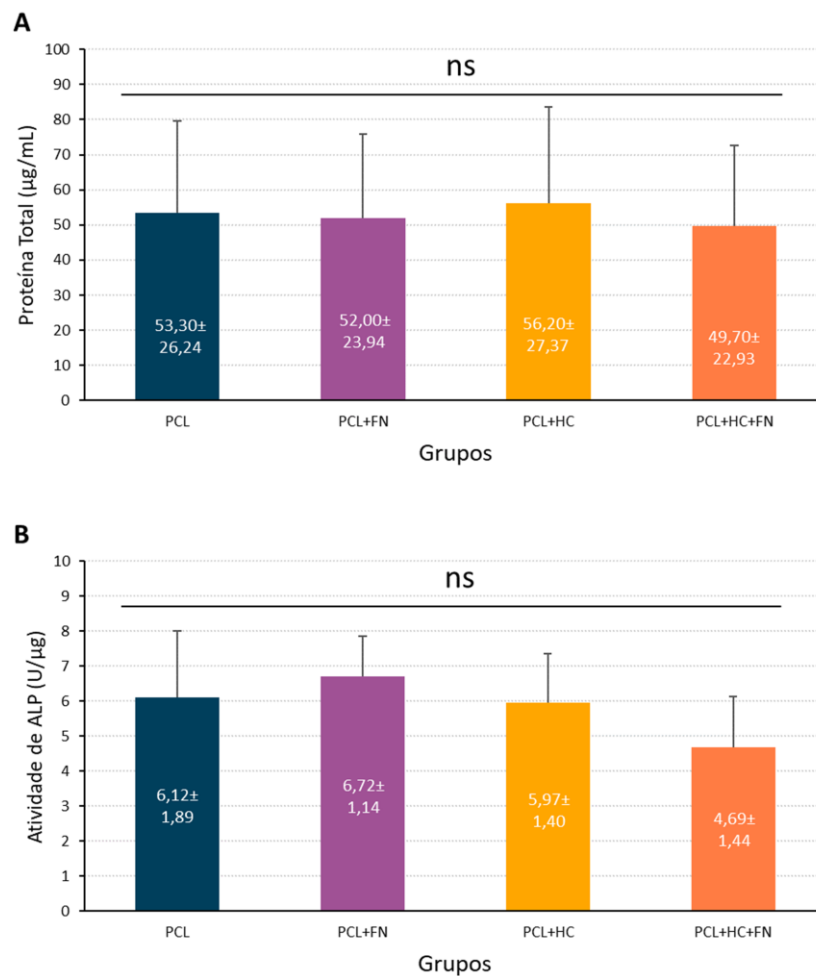


Fonte: Elaboração própria.

Os resultados da quantificação de proteína total (ANOVA; $F=0,093$; $p=0,964$) e atividade de ALP (ANOVA; $F=2,602$; $p=0,072$) em 14 dias de cultivo estão representados graficamente na Figura 20, demonstrando que a formulação dos *scaffolds* não foi capaz de alterar significativamente esses resultados no período

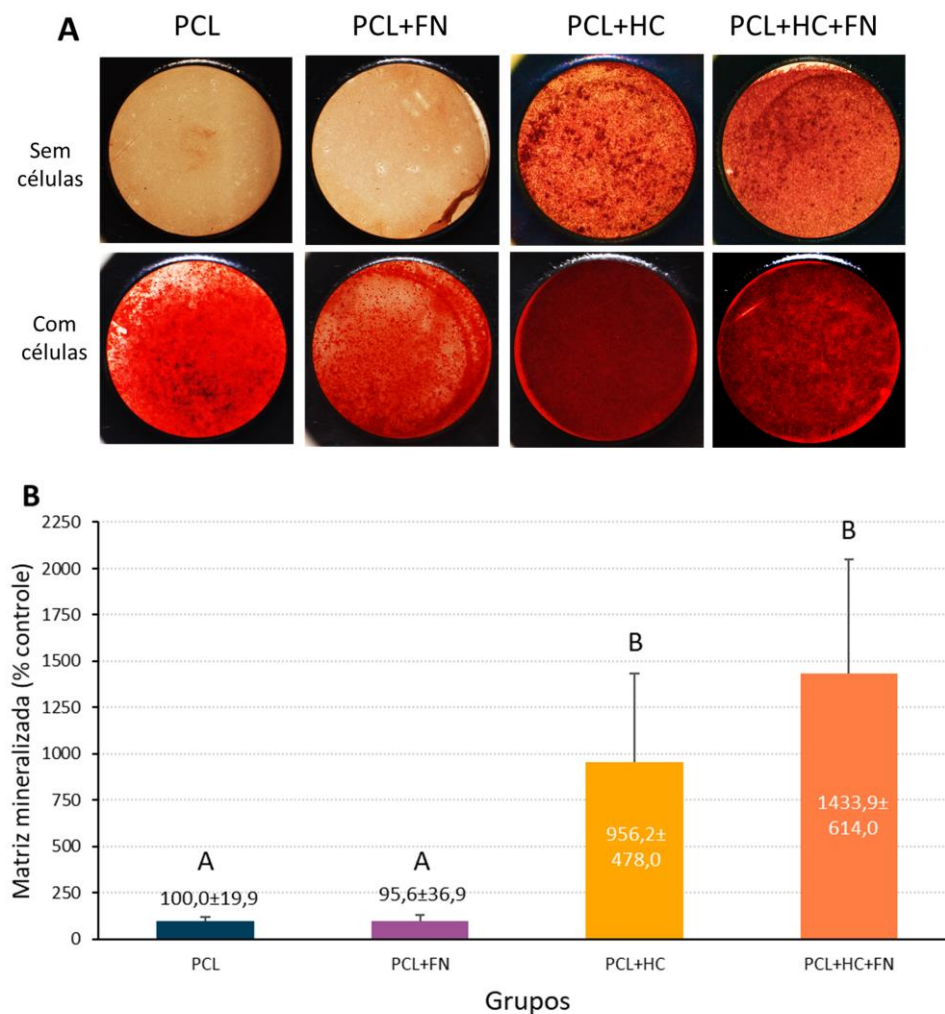
avaliado. A incorporação de HC aos *scaffolds* teve efeito sobre a produção de matriz mineralizada em HDPCs (ANOVA de Welch; $F=19,227$; $p<0,001$) (Figura 21), causando aumento na produção quando comparado ao controle (Games-Howell; $p\leq 0,006$), sem diferença entre os grupos devido a presença ou não de fibronectina (Games-Howell; $p\geq 0,345$).

Figura 20- Gráficos de barras representando dosagem de proteína total e atividade de fosfatase alcalina. **(A)** Dosagem de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) e **(B)** atividade de ALP ($\text{U}/\mu\text{g}$ de proteína total) de HDPCs em 14 dias de cultivo sobre os *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN ($20 \mu\text{g/mL}$). Colunas representam valores médios e barras de erro indicam os desvios-padrão. ns = ausência de significância estatística entre os grupos ($p>0,05$, ANOVA, $\alpha=5\%$, $n=8$).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 21- Paineis de imagens e gráfico de barras representativo da formação de nódulos de mineralização. **(A)** Paineis de imagens representativas dos *scaffolds* submetidos à coloração com *Alizarin Red*. **(B)** Formação de matriz mineralizada (% relativa ao grupo “PCL”) após 21 dias de cultivo de HDPCs sobre os *scaffolds* contendo ou não 0,4% HC e/ou FN (20 µg/mL). Colunas representam valores médios de matriz mineralizada e barras de erro indicam os desvios-padrão. Grupos identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente. (ANOVA de Welch e Games Howell, $\alpha=5\%$, $n=8$).



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Polímeros sintéticos como a policaprolactona (PCL) têm ganhado espaço na engenharia tecidual devido às suas propriedades mecânicas, biodegradabilidade, baixo custo e estabilidade estrutural tanto em temperatura ambiente como corporal^{13,14}. O polímero PCL também apresenta alta capacidade de processamento, permitindo a obtenção de nanofibras uniformes, que mimetizam a matriz extracelular⁵³. *Scaffolds* nanofibrilares de PCL a 10%, obtidos pela técnica de *electrospinning*, favorecem a adesão, espalhamento e proliferação de células da polpa dental humana (HDPCs) e, portanto, são considerados citocompatíveis²⁴. Os dados do presente estudo ratificam a ausência de efeito tóxico dos *scaffolds* de PCL sobre HDPCs. Em comparação a viabilidade das células semeadas sobre lamínulas de vidro, houve um aumento significativo da viabilidade de HDPCs semeadas sobre os *scaffolds* de PCL em todos os períodos avaliados. No período de 24h, a viabilidade celular foi 5,8× maior quando os *scaffolds* foram utilizados como substrato, enquanto nos períodos de 7 e 14 dias, esse aumento foi de 3,8× e 1,8×, respectivamente. A citocompatibilidade dos *scaffolds* de PCL também pode ser observada nas imagens de fluorescência obtidas no ensaio de Live/Dead, uma vez que existe pouquíssimas células em processo de morte nos diferentes períodos de análise. A adesão, proliferação e diferenciação de fibroblastos da polpa dental humana são favorecidas na presença de biomateriais com topografia nanofibrilar em comparação a superfícies lisas¹⁸, uma vez que o aumento da área de superfície e uma rede de poros intercomunicados permite trocas metabólicas entre as células^{13,55,60}. A topografia nanofibrilar porosa e a interconectividade dos *scaffolds* de nanofibras de PCL 10% sintetizados no presente estudo podem ser observadas nas imagens de MEV.

A despeito do aumento no metabolismo de HDPCs quando semeadas sobre os *scaffolds* em comparação a lamínula de vidro, a incorporação de moléculas bioativas as nanofibras visa estimular a quimiotaxia e posterior diferenciação celular, eventos esses fundamentais para a reparação tecidual¹⁵. Fases minerais como a nano-hidroxiapatita e o hidróxido de cálcio (HC) têm sido investigadas com esse propósito^{20,29,59}. A incorporação de HC em *scaffolds* de quitosana, por exemplo, apresenta efeitos positivos sobre o metabolismo e diferenciação de HDPCs⁵⁶. Entretanto, ainda não existem estudos sobre a incorporação de HC ao polímero PCL. Assim, o presente estudo objetivou, inicialmente, sintetizar e caracterizar *scaffolds* de nanofibras a base de PCL incorporados com HC quanto a sua morfologia (diâmetro

das fibras e espaços interfibrilares), composição química, solubilidade, alteração de pH do meio e liberação de cálcio.

A incorporação de HC nas concentrações investigadas, não inviabilizou a eletrofiação da solução polimérica de PCL e resultou em aumento significativo do diâmetro das nanofibras, com os maiores diâmetros observados para a concentração de 0,4%. Entretanto, não houve alteração na porcentagem dos espaços interfibrilares, importantes para a migração celular no interior do *scaffold*. A técnica de *electrospinning* é uma das mais utilizadas quando o objetivo é obter nanofibras regulares e aleatórias¹⁹. Todos os parâmetros utilizados (distância entre a agulha e o coletor, voltagem e velocidade de ejeção do polímero) foram definidos em estudos piloto. A adição de partículas minerais modifica as propriedades físicas da solução polimérica, como condutividade⁵⁹, viscosidade e tensão superficial⁶². Como resultado, foram formadas nanofibras mais calibrosas e com maior irregularidade, observada nas imagens de MEV e histogramas da distribuição dos diâmetros das nanofibras, respectivamente. A alta condutividade elétrica do HC explica o aumento do diâmetro e irregularidade das nanofibras em função do aumento da concentração dessa fase mineral^{59,68}.

A porcentagem de espaços interfibrilares não foi afetada pelo HC, independentemente da concentração desse mineral incorporada ao polímero. Esse resultado é justificado pela manutenção dos parâmetros durante a eletrofiação, incluindo tempo, temperatura e pressão do ambiente⁵⁹, e não restrição da área de projeção das nanofibras. Assim, uma vez que a quantidade de polímero ejetada seja mantida, mesmo que o padrão de deposição das fibras cause uma alteração no diâmetro, é esperado uma porcentagem de espaços interfibrilares semelhante. Os valores correspondentes a porcentagem de espaços interfibrilares encontrados no presente estudo (média dos grupos incorporados com HC 22,2%), corroboram com os dados já citados na literatura^{24,58}.

O processo de degradação hidrolítica de nanofibras do PCL é o mais lento entre os poliésteres, devido a presença de cinco unidades -CH₂ hidrofóbicas em sua cadeia. Esse processo pode durar de 2-4 anos^{25,26} e ocorre, inicialmente, por uma autocatálise não-enzimática com a quebra das ligações de éster na cadeia hidrolítica. Na sequência, ocorre absorção da água para as porções mais internas da matriz polimérica, podendo ocorrer ganho de massa, e culminando com a hidrólise do polímero. Somente no processo final de degradação é que ocorre a perda de massa

propriamente dita, devido a redução da taxa de cisão da cadeia hidrolítica^{27,61}. Devido a hidratação inicial, a perda de massa pode levar até 6 meses para começar a ocorrer²⁵. No presente estudo, a perda de massa foi lenta e semelhante para todos os grupos nos períodos analisados, sugerindo que a incorporação de HC não exerceu efeito sobre a solubilidade dos *scaffolds*. Esse fator é importante para o processo de reparação do complexo dentino-pulpar, uma vez que para que ocorra a mineralização da matriz secretada pelas células odontoblastóides e, consequente formação da barreira mineralizada, são necessários aproximadamente 60 dias⁷⁸. Outros polímeros, como quitosana, apesar de apresentarem elevada biocompatibilidade, precisam de tratamento adicional com agentes promotores de ligações cruzadas para manter sua estrutura por um período adequado para a regeneração dentinária⁵⁶.

A dissociação do HC em água ocorre por meio de uma reação reversível onde são produzidos íons Ca^{2+} e radicais OH^- ⁶⁸, sendo os últimos responsáveis pelo aumento do pH do meio. Portanto, é esperado que quanto maior a liberação de Ca^{2+} , mais básico seja o pH do meio. Além disso, a alta solubilidade do HC em meio aquoso faz com que exista uma alta liberação de Ca^{2+} inicial, a qual é quase completa em até 15 dias⁷¹. Os dados do presente estudo mostraram uma maior liberação nas primeiras 24 horas, proporcional à quantidade de HC incorporada ao polímero, e redução gradual até quantidades não detectáveis pela metodologia utilizada, em função do tempo, com exceção da concentração de 0,1%. Para essa concentração, nenhum Ca^{2+} foi detectado após 3 dias de imersão em água, enquanto para a concentração de 0,2%, a liberação esgotou-se aos 5 dias. Entretanto, os níveis de Ca^{2+} liberados não influenciaram o pH do meio de forma significativa. Mesmo para *scaffolds* incorporados com 0,4% HC, o pH se manteve na faixa da neutralidade (6,9-7,9), proporcionando um microambiente com pH favorável a proliferação de HDPCs⁷². Em cultura primária de osteoblastos de roedores o Ca^{2+} (3,5 mM) foi capaz de induzir diferenciação osteoblástica e formar a maior quantidade de nódulos de mineralização apenas em meio neutro (pH 7,4)⁷⁹. Sugerindo que a concentração liberada pelo grupo incorporado com 0,4% HC somadas com o meio de cultura utilizado (~4 mM), com a manutenção do pH possa induzir maior formação de nódulos de mineralização em cultura de HDPCs.

A incorporação de HC em *scaffolds* visa a liberação controlada de íons, potencializando os efeitos positivos do Ca^{2+} ^{20,56}. Porém, o papel desse íon na formação de dentina terciária reparadora ainda é controverso. Em um estudo⁸⁰ onde

foi realizado o capeamento pulpar direto de dentes de cães com hidróxido de cálcio radiomarcado, não foi encontrado na área de dentina reparadora o marcador radioativo, sugerindo que o Ca^{2+} necessário para a formação da dentina terciária é proveniente da polpa e não do hidróxido de cálcio aplicado na exposição. Apesar disso, existem evidências indicando que o influxo de Ca^{2+} no ambiente extracelular pode ativar os canais de cálcio não-específicos, aumentando a proliferação e ativando vias de sinalização intracelular como ERK1/2⁸¹, MAPK/ERKs, MAPK/JUNKs⁸², mTOR e CaMK2⁷⁴ junto com a síntese de DSPP, ALP⁵⁶, fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN)^{73,83}. Essas proteínas estão envolvidas na regulação de processos fisiológicos, assim como na mediação dos processos de mineralização^{69,70}.

A viabilidade, a adesão e o espalhamento de HDPCs semeadas sobre os *scaffolds* de nanofibras de PCL incorporados com as diferentes concentrações de HC também foram avaliadas no presente estudo. Em comparação ao grupo PCL (controle), apenas a incorporação de 0,4% HC resultou em aumento significativo da viabilidade celular. A concentração média de Ca^{2+} de 2,1 mM liberada por materiais a base de HC induz a proliferação celular de HDPCs, enquanto nenhum efeito foi visto para uma concentração mais baixa (1,7 mM)⁵¹. No presente estudo, a liberação de Ca^{2+} detectada para *scaffolds* de PCL incorporados com 0,4% de HC foi de ~2,20 mM, somada a concentração já presente no meio de cultura α -MEM (~1,8 mM) a quantidade média disponível para as células seria de 4 mM, podendo-se sugerir que concentrações mais altas também são capazes de bioestimular HDPCs. As imagens de fluorescência obtidas no ensaio Live/Dead, além de ratificarem a citocompatibilidade dos *scaffolds*, também ilustram o aumento da proliferação celular nos diferentes períodos avaliados.

A resposta celular é modulada pela topografia de superfície do substrato^{13,18,55,60,84} e as características morfológicas e físico-químicas do material utilizado para a produção desse substrato influencia o metabolismo, o espalhamento e a diferenciação celular^{19,54}. Além do aumento do metabolismo e proliferação das HDPCs, a análise qualitativa das imagens da Figura 9 no período de 7 dias permite inferir que houve um maior espalhamento celular em função da concentração de HC incorporada ao *scaffold*. O tamanho ideal de poro para adesão celular varia entre 5 e 500 μm dependendo da cultura celular utilizada⁵². Embora tenha sido avaliado o espalhamento celular apenas na superfície do *scaffold*, a interconectividade dos poros

também é importante para permitir trocas metabólicas e o deslocamento das células para o interior do *scaffold*⁵⁶. Assim, uma vez que foi utilizada no presente estudo uma cultura mista de células da polpa, maior variabilidade na distribuição do tamanho dos poros pode favorecer a maior adesão e espalhamento celular¹⁹.

O principal problema com a utilização de materiais a base de hidróxido de cálcio para o capeamento pulpar direto é a morte celular e a perda tecidual devido a necrose de coagulação induzida pelo pH altamente alcalino desses materiais^{6,12}. Os *scaffolds* avaliados no presente estudo, incorporados com 0,4% HC, apresentaram solubilidade e liberação de cálcio lentas, propiciando a manutenção do pH do meio próximo do neutro. A combinação desses efeitos não induz morte celular e suas características estruturais de superfície favorecem a adesão e o espalhamento de HDPCs. Entretanto, considerando a aplicação *in vivo* e os princípios da engenharia tecidual, também é relevante que esses *scaffolds* apresentem quimiotaxia, atraindo células residentes indiferenciadas para então bioestimular a sua diferenciação. O potencial quimiotático do HC já foi demonstrado em cultura primária de células-tronco da polpa dental de ratos. Na concentração de 1 µg/mL, HC foi capaz de induzir a interação *EphB2-ephrinB1* nos diferentes estágios celulares, controlando a migração, proliferação e diferenciação celular⁸⁵. Devido a maior concentração de cálcio liberada pelos *scaffolds* experimentais ser mais baixa (~0,87 µg/mL) e regredir ao longo do tempo, a incorporação de uma molécula com forte potencial quimiotático se torna interessante.

Fibronectina (FN) é uma glicoproteína de alto peso molecular (~440 kDa) que atua como mediador em várias interações celulares com a MEC e apresenta importante papel na migração, adesão, crescimento e diferenciação celular^{35,86}. Diferentes células pulpares produzem FN⁸⁷ e esse mediador está envolvido nas fases iniciais da diferenciação de novos odontoblastos de reposição aos odontoblastos primários e na subsequente formação de dentina terciária³⁵. Assim, também foi objetivo desse trabalho avaliar os efeitos da adsorção de FN nos *scaffolds* de nanofibras de PCL sobre HDPCs.

A presença de FN dessa proteína ao longo das nanofibras dos *scaffolds*, com ou sem a incorporação de HC, foi validada por imunofluorescência. O mesmo foi demonstrado anteriormente por Leite e colaboradores⁶⁶. Entretanto, a adsorção de FN não foi essencial para a migração celular. Em comparação ao PCL (controle), a migração de HDPCs foi estatisticamente maior para os *scaffolds* contendo HC e/ou

FN, sem diferença significativa entre eles. Uma possível explicação para a ausência de efeito quimiotático exercido pela FN é que íons Ca^{2+} , por si só, induzem a expressão de FN em células da polpa dental humana⁷⁵. Portanto, estudos futuros devem avaliar a expressão gênica de FN1 e a síntese de FN por HDPCs semeadas sobre *scaffolds* de PCL contendo HC para validar essa hipótese. Também pode-se atribuir o efeito quimiotático do HC a expressão de *ephrinB1* e *EphB2* nos estágios de proliferação e diferenciação celular. A inibição de *ephrinB1* e estimulação de *EphB2* no estágio de proliferação induz a quimiotaxia celular, enquanto a estimulação da expressão dos dois genes no estágio de diferenciação provoca a diferenciação odontoblástica/osteoblástica⁸⁵.

Promoção da adesão, espalhamento e proliferação de HDPCs foram mais intensos na presença de HC quando comparados ao controle ou aos *scaffolds* contendo exclusivamente FN, especialmente nos períodos mais longos. Resultados diferentes foram observados quando *scaffolds* nanofibrilares de PCL foram adsorvidos com FN na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ⁶⁶, metade da concentração utilizada no presente estudo. Neste trabalho, os autores observaram que a presença de FN promoveu a proliferação, adesão e espalhamento de células da papila apical de dentes humanos (hAPCs), possibilitando sugerir que *scaffolds* de PCL adsorvidos com FN poderiam estimular a regeneração pulpar de dentes com rizogênese incompleta comprometidos endodonticamente. Entretanto, nenhuma fase mineral foi utilizada.

Viabilidade celular e formação de nódulos mineralizados também não foram influenciados pela presença exclusiva de FN. Entretanto, houve aumento da viabilidade de HDPCs quando a FN foi associada a fase mineral (0,4% HC). O aumento da viabilidade celular é um evento fundamental na engenharia tecidual, uma vez que migradas para o interior do material e aderidas, as células precisam manter sua viabilidade para a diferenciação e secreção de um novo tecido. O efeito do Ca^{2+} na viabilidade celular já foi discutido previamente, enquanto o papel da FN parece estar ligado com o aumento na interação célula-polímero. Por ser uma proteína adesiva, a presença de FN pode aumentar a adesão das células a superfície polimérica e a interação das células entre si⁶⁴.

A expressão gênica de ALPL e DSPP não foi influenciada pela adição de HC e/ou FN aos *scaffolds* de PCL, enquanto houve pequena, embora estatisticamente significativa, regulação negativa do gene que codifica para o colágeno tipo I (COL1A1). Essa proteína fibrilar é a mais abundante da matriz dos tecidos mineralizados, osso,

dentina e cimento⁸⁸. Colágeno tipo I corresponde à 90% da fração proteica da matriz dentinária, enquanto proteínas não colagenosas compõem os restantes 10%². No presente estudo, a análise da expressão gênica foi realizada após 21 dias da cultura celular sobre os *scaffolds*. Entretanto, tem sido demonstrado que o pico de expressão de COL1A1 para HDPCs, in vitro, é de 14 dias, ocorrendo uma redução dessa expressão aos 21 dias⁶⁴. Isso ocorre uma vez que, por se tratar de um período mais tardio, espera-se que o processo de deposição da MEC esteja na sua fase final de mineralização, como observado para a formação de nódulos mineralizados. Nessa fase, deve ocorrer expressão aumentada para genes relacionados ao processo de mineralização, como o gene que codifica a proteína da matriz dentinária 1 (DMP1)⁸⁹.

A proteína da matriz dentinária 1 é a principal proteína não colagenosa da dentina, também presente nos ossos^{89,90} e um importante marcador do fenótipo odontoblástico⁸⁹. Devido a sua característica ácida, essa proteína possui capacidade de se ligar a íons regulando a enucleação de hidroxapatita para dentro do colágeno presente na matriz⁹⁰. Assim, a presença de íons Ca^{+2} no ambiente extracelular, propiciada pelos *scaffolds* incorporados com HC regulou positivamente a expressão de DMP1 por células da polpa dental humana. O mesmo não pode ser afirmado para a presença de FN.

O desfecho final da resposta reparadora do complexo dentino-pulpar é a produção de matriz mineralizada a fim de criar uma barreira que seja capaz de selar a exposição pulpar, mantendo a vitalidade da polpa dental remanescente. Embora não tenham sido observadas diferenças significantes na quantidade de proteína total e na atividade de fosfatase alcalina, a incorporação de 0,4% HC ao *scaffold* de PCL aumentou ~9,6× a produção de matriz mineralizada após 21 dias de cultura. Quando os *scaffolds* foram carregados com ambos, HC e FN, esse aumento chegou a ser ~14,3× superior em comparação ao PCL (controle). Entretanto, a presença exclusiva de FN não exerceu efeito na formação de matriz mineralizada. A presença de grande quantidade de nódulos mineralizados aos 21 dias justifica a regulação negativa da expressão de COL1A1 observada para os *scaffolds* incorporados com HC e/ou FN.

Assim, *scaffolds* de PCL incorporados com HC na concentração de 0,4% são potenciais candidatos para estudos futuros em diferentes níveis, como estudos em animais. Pelos dados obtidos no presente estudo, espera-se que a aplicação desses *scaffolds* sobre a polpa exposta estimule o recrutamento de células do tecido pulpar, as quais encontrarão um ambiente favorável morfológicamente e quimicamente à

proliferação e diferenciação em células odontoblastóides, culminando com a substituição do *scaffold* por matriz dentinária mineralizada. Esses eventos devem ocorrer sem causar morte celular e perda tecidual, efeitos indesejáveis ocasionados pelos atuais materiais à base de hidróxido de cálcio disponíveis para aplicação sobre a polpa⁶.

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.

ANEXO

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Potencial bioativo de scaffolds de nanofibras contendo cálcio e associados à fibronectina sobre células pulpares humanas

Pesquisador: JOSIMERI HEBLING COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18119319.9.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.636.926

Apresentação do Projeto:

O tecido pulpar de dentes humanos é uma rica fonte de células mesenquimais indiferenciadas e, por esta razão, apresenta grande potencial reparador. Apesar disso, os capeadores pulpares diretos utilizados atualmente para promover a reparação desse tecido, em sua maioria, a base de hidróxido de cálcio, causam necrose superficial da polpa, a qual resulta em intensa morte celular e inflamação, desrespeitando os preceitos de biocompatibilidade e bioatividade esperados. Portanto, ainda é necessário o desenvolvimento de novos materiais para a aplicação direta sobre a polpa. A engenharia tecidual tem possibilitado o desenvolvimento de novas propostas de tratamento baseadas em três pilares básicos, células, matriz de suporte e moléculas sinalizadoras. Transpondo essa tríade para a biologia pulpar, as células tronco residentes no tecido seriam atraídas por quimiotaxia para uma matriz nanofibrilar e então induzidas a sofrer diferenciação em células com fenótipo odontoblástico. Portanto, o presente trabalho objetiva sintetizar e caracterizar scaffolds de nanofibras à base de policaprolactona (PCL) incorporados com baixas concentrações de uma fase mineral, bem como avaliar sua bioatividade sobre células da polpa dental humana (HDPCs), quando associados à fibronectina. No Estudo 1, diferentes concentrações de hidróxido de cálcio serão incorporadas a scaffolds de PCL confeccionados pela técnica de electrospinning. Esses scaffolds serão caracterizados quanto à morfologia (MEV) e composição química (EDS), e analisados quanto a degradação hidrolítica, alteração de pH do meio e liberação de cálcio. Adicionalmente, também será realizada a avaliação da viabilidade (alamarBlue),

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA**



Continuação do Parecer: 3.636.926

proliferação (ensaio de Live/Dead), adesão e espalhamento celular (F-actina) de HDPCs, coletadas a partir de 4 terceiros molares humanos hígidos, recém extraídos, de pacientes de ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 25 anos, atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Com base nos resultados biológicos do Estudo 1, a melhor concentração de cálcio será selecionada para a realização do próximo estudo. Assim, no Estudo 2, scaffolds contendo a melhor concentração de hidróxido de cálcio serão tratados com fibronectina (20 µg/mL) e serão avaliados quanto a migração (Trans-well), viabilidade (alamarBlue), proliferação (ensaio de Live/Dead), adesão e espalhamento celular (Factina), atividade de fosfatase alcalina (ensaio de ponto final), formação de nódulos de mineralização (Alizarin red) e expressão gênica de marcadores de diferenciação odontogênica (RT-PCR). O tamanho da amostra (n) sofrerá variação de acordo com o protocolo experimental. Os dados de cada variável resposta serão avaliados quanto à aderência a curva normal e homocedasticidade dos grupos e, com base no preenchimento ou não desses requisitos, serão selecionados os testes mais apropriados. O nível de significância para a tomada de decisão estatística será de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar a síntese e caracterização de scaffolds de nanofibras à base de policaprolactona (PCL) incorporados com baixas dosagens de hidróxido de cálcio, bem como avaliar seus efeitos bioativos sobre células da polpa dental humana (HDPCs) quando associados à fibronectina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pacientes submetidos à exodontia podem sofrer riscos inerentes ao procedimento cirúrgico. No entanto, para minimizar/evitar tais riscos, será realizada terapia medicamentosa profilática. Também serão empregados cuidados trans-operatórios de assepsia e antisepsia, associados à utilização de materiais estéreis. Orientações pós-operatórias também serão realizadas no que se refere à higienização, administração de terapia medicamentosa e repouso, além de agendamento retornos periódicos para acompanhamento do caso. O risco de contaminação dos pesquisadores será evitado ou minimizado através do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), seguindo as normas de biossegurança, durante a manipulação dos dentes, reagentes e soluções usadas nos diversos experimentos. Os EPIs utilizados serão: máscara, gorro, luva e avental descartáveis, óculos de proteção e sapato fechado.

Benefícios: Considerando a escassez de materiais disponíveis no mercado que visem o reestabelecimento da vitalidade pulpar, propor o desenvolvimento de um biomaterial inovador, que ao induzir a regeneração do complexo dentino-pulpar permita a manutenção da vitalidade

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA**



Continuação do Parecer: 3.636.926

pulpar, pode ser de grande relevância para todas as áreas da Odontologia. Ao concluirmos o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, esperamos obter um ou mais biomateriais com potencial de indução de células-tronco da polpa dental humana no processo de neoformação de um tecido dentinário e pulpar com características muito semelhantes aos tecidos fisiológicos. Isto porque a preservação estrutural e funcional do elemento dentário, permitirá a manutenção da condição saudável do sistema estomatognático e fornecerá condições clínicas que favoreçam, quando necessário, a execução de procedimentos operatórios seguros dentro das diversas especialidades odontológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de maneira satisfatória e justificada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 11 de outubro de 2019.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1404555.pdf	12/09/2019 10:47:48		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Cirurgia.pdf	12/09/2019 10:44:19	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_CEP_01_08.pdf	02/08/2019 14:34:10	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_reformulado_Carol_01_08.pdf	02/08/2019 14:33:42	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA**



Continuação do Parecer: 3.636.926

Outros	chefe_departamento.pdf	30/07/2019 14:56:41	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cumpeimentos.pdf	30/07/2019 14:51:06	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	lpeb.pdf	30/07/2019 14:50:45	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostoassinada.pdf	30/07/2019 14:46:52	JOSIMERI HEBLING COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 11 de Outubro de 2019

**Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))**

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho até 8 de março de 2023.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 8 de março de 2021.

Caroline Anselmi de Oliveira