

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/06/2023.



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



**Igor Paulino Mendes Soares**

***Scaffolds* nanofibrilares de policaprolactona/nano-hidroxiapatita para  
regeneração do complexo dentino-pulpar: síntese, caracterização e avaliação  
em células pulpareas humanas**

**Araraquara**

**2021**



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



**Igor Paulino Mendes Soares**

***Scaffolds* nanofibrilares de policaprolactona/nano-hidroxiapatita para regeneração do complexo dentino-pulpar: síntese, caracterização e avaliação em células pulpares humanas**

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

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josimeri Hebling**

**Araraquara**

**2021**

S676s

Soares, Igor Paulino Mendes

Scaffolds nanofibrilares de policaprolactona/nano-hidroxiapatita para regeneração do complexo dentino-pulpar: síntese, caracterização e avaliação em células pulpares humanas / Igor Paulino Mendes Soares. -- Araraquara, 2021

80 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Josimeri Hebling

1. Nanofibras. 2. Engenharia tecidual. 3. Biomineralização. 4. Capeamento da polpa dentária. 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.

**Igor Paulino Mendes Soares**

***Scaffolds* nanofibrilares de policaprolactona/nano-hidroxiapatita para regeneração do complexo dentino-pulpar: síntese, caracterização e avaliação em células pulpares humanas**

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia**

Presidente e orientador: **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josimeri Hebling**

2º Examinador: **Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**

*School of Dentistry – University of Michigan  
Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics*

3º Examinador : **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisele Faria**

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

Araraquara, 08 de junho de 2021.

## **DADOS CURRICULARES**

**Igor Paulino Mendes Soares**

NASCIMENTO: 01/10/1996 – Bebedouro – SP

FILIAÇÃO: Davi Mendes Soares e Necinei Paulino Soares

2014/2018 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2019/2021 Mestrado Acadêmico em Odontologia, área de Reabilitação Oral, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

## ***Dedico este trabalho***

***Aos meus pais Davi e Necinei,***

Por iluminação Divina e sem medir esforços, vocês guiam e fortalecem meu caminho com amor, carinho, dedicação, sabedoria e compreensão em todos os momentos. Por vocês cultivo os mais generosos sentimentos: respeito, amor e admiração. Se ao longo da minha vida posso colher frutos, foi porque vocês me fizeram florescer.

***À minha irmã Laís***

Por ser companheira e me ensinar que amor é multiplicar. Embora em algum momento eu possa parecer exemplo pra você como irmão mais velho, saiba que é você, com sua personalidade e doçura que me inspiram.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida orientadora, Professora Jô (Josimeri Hebling), por ter me acolhido no meu último ano de graduação como seu aluno de Iniciação Científica e ter permitido que eu participasse de sua jornada. A senhora demonstra a todo momento a essência do que é ser pesquisador e docente. Sua humildade, serenidade, honestidade e dedicação ao trabalho e à família me inspiram todos os dias. A confiança que deposita em mim me motiva todos os dias a buscar cada vez mais conhecimento de uma forma extremamente prazerosa.

Ao professor Beto (Carlos Alberto de Souza Costa), por ser mais que um professor e me orientar em muitos sentidos da vida profissional e pessoal. Agradeço por ter aberto as portas de seus laboratórios solidificados ao longo de tantos anos de trabalho duro e honesto. Mais que isso, por ter confiado suas conquistas a mim, proporcionando experiências de vida ímpares que levarei comigo para sempre. Admiro o senhor e tenho prazer em poder contribuir sempre com o que precisar.

À minha irmã de coração Caroline Anselmi de Oliveira, por ter me acompanhado desde o primeiro ano de Graduação e ter permanecido após isso: este trabalho é mais uma de nossas aventuras. Acredito que nossas personalidades tão opostas e complementares possam ser o grande motivo da nossa boa relação: muito do que falta em mim encontro em você. É um prazer poder compartilhar minha vida pessoal e profissional, seja em momentos de felicidade, tristeza, importantes ou fúteis. Independentemente de qualquer circunstância, sei que você sempre esteve, está e estará lá. E eu também por você.

À Malu (Maria Luísa de Alencar e Silva Leite), quem me recebeu como um colega de trabalho e se tornou uma amiga de coração com quem posso contar. Agradeço imensamente por ter compartilhado tantos conhecimentos e experiências comigo, sejam profissionais ou pessoais. Este trabalho é também fruto seu e de toda sua dedicação em ensinar. Saiba que você é uma pessoa admirável em todos os sentidos e ilumina os lugares que passa.



Ao meu companheiro Vinicius Krieger Costa Nogueira, pelo privilégio de compartilhar sua vida comigo há mais de 7 anos. Obrigado por tanta paciência, carinho e amor. Você me inspira, conforta, incentiva e faz com que meus dias comecem e terminem leves, quer esteja perto ou longe. Admiro e me espelho em muitas de suas virtudes pessoais e profissionais.

Aos meus amigos Rafael Antonio de Oliveira e Fernanda Ali Kitagawa, por serem mais que colegas de trabalho. Vocês são pessoas tão iluminadas que aceitaram compartilhar desafios comigo com muito bom humor, paciência, dedicação e cumplicidade. Vocês são muito especiais e foram fundamentais para que este trabalho fosse possível.

A tantos colegas e parceiros que já convivi ou ainda convivo nos laboratórios: Uxua, Isabela, Laís, Marlon, Beatriz, Lays, Carla, Fernanda, Taísa, Gabriel, Cristiano, Maitê. Todos vocês me proporcionaram experiências e trocas de conhecimento muito valiosas durante o Mestrado que vou levar para toda a vida. Dentre essas pessoas, destaco Giovana Anovazzi, quem me coorientou durante a Iniciação Científica e me introduziu aos experimentos com cultura de células: foi um prazer trabalhar com você, sinto saudade. Ainda, agradeço pela oportunidade de coorientar e trabalhar com as alunas de Iniciação Científica Isabela, Rafaella, Lídia e Giovanna: com vocês só tive trocas muito boas, obrigado por sempre estarem presente ajudando com tudo, também estou aqui por vocês. A todas essas pessoas desejo o bem e um futuro brilhante.

A todos os meus familiares e amigos que, independentemente da distância, me incentivam, acolhem, confortam, divertem e fazem minha vida ser especial e ter sentido. Incluo aqui também, as pessoas com quem dividi ou divido moradia em Araraquara, os colegas e professores da pós-graduação e todos que de alguma forma me ajudaram e trocaram experiências pessoais e profissionais ao longo de tantos anos. Peço desculpas por não listar nomes (são muitos!), mas vocês sabem que têm meu coração.

Aos professores da Graduação e Pós-graduação, por tantos ensinamentos sobre Odontologia, Docência, Pesquisa e sobre a vida. Agradecimento especial aos

professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Não posso deixar de citar as professoras Juliana Alvares Duarte Bonini Campos e Livia Nordi Dovigo, que me proporcionaram conhecimentos sobre bioestatística essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, construindo uma base sólida para meu crescimento como pesquisador. Mais que isso, vocês me reafirmaram o quanto o conhecimento é valioso, porque ninguém pode tirar da gente. Obrigado por tanto.

Às Professoras Fernanda Gonçalves Basso e Marlise Inêz Klein Furlan pela participação como comissão examinadora dos Exames de Pré-qualificação e Qualificação deste trabalho. O conhecimento de vocês fortaleceu muito o desenvolvimento e conclusão desta Dissertação. Muito obrigado pela disposição.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais aos cuidados do Professor Beto, por oferecer a estrutura necessária para que este e tantos outros estudos pudessem ser realizados. Aproveito para agradecer ao Departamento de Fisiologia e Patologia pela disponibilidade de outros laboratórios complementares para a realização deste trabalho, também pela ajuda da secretária Carla e dos técnicos Zé e Juliana.

Ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Morfologia e Clínica Infantil, aos cuidados da Professora Jô, por ter dado suporte a este e muitos outros trabalhos desenvolvidos ao longo do meu Mestrado. Agradeço também a todos os funcionários do departamento, em especial à Dulce e Flávia pela disponibilidade e parceria; e ao Pedrinho do Laboratório de Histologia, por ter se prontificado a me ensinar dedicação seus conhecimentos sobre processamento histológico.

À Unesp, em especial à Faculdade de Odontologia de Araraquara, por ser uma casa muito querida que permite meu crescimento pessoal e profissional há tantos anos. Agradeço a todos que nela trabalham: desde à Reitoria, à Diretoria desta faculdade representada pelo Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos (Edinho) e à Vice-Diretora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, pessoas especiais que sempre me apoiaram e me deram o privilégio de trocar muitos conhecimentos e experiências profissionais e pessoais; aos funcionários técnico-administrativos, da

limpeza e todos que são essenciais para que tudo aconteça. Também ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial à Área de Reabilitação Oral.

Aos pacientes atendidos nas clínicas da faculdade, aos voluntários desconhecidos que doaram seus dentes para esta e outras pesquisas e à população como um todo, que financia indiretamente esta e outras pesquisas ao pagar impostos, contribuindo para o avanço do conhecimento.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/07400-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

*“Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do voo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o voo.*”

*Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são os pássaros em voo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o voo, isso elas não podem fazer, porque o voo já nasce dentro dos pássaros. O voo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.”*

Rubem Alves\*

---

\* Alves R. Por uma educação romântica. Brasil: Papyrus Editora; 2013.

Soares IPM. *Scaffolds* nanofibrilares de policaprolactona/nano-hidroxiapatita para regeneração do complexo dentino-pulpar: síntese, caracterização e avaliação em células pulpares humanas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## RESUMO

Visando uma terapia citocompatível e bioativa para aplicação sobre o tecido pulpar exposto, neste estudo foram desenvolvidos e caracterizados *scaffolds* nanofibrilares de policaprolactona (PCL) incorporados com nano-hidroxiapatita (nHA) e foi avaliada a resposta de células da polpa dental humana (HDPCs) semeadas sobre esses *scaffolds*. Soluções de PCL (10% m/v em clorofórmio/dimetilformamida) foram incorporadas ou não com nHA (0,5; 1,0; ou 2,0% m/v) e eletrofiadas em *scaffolds*. Os *scaffolds* foram caracterizados quanto à morfologia (MEV), composição (EDS), solubilidade (alteração de massa), liberação de cálcio/fosfato (espectrofotometria) e modulação do pH do meio. HDPCs foram cultivadas na superfície dos *scaffolds* e avaliadas quanto à viabilidade (*Live/Dead* e *AlamarBlue*) e adesão/espalhamento celular (F-actina) ao longo do tempo. A expressão dos genes COL1A1, ALPL, DSPP e DMP1 (RT-qPCR), dosagem de proteínas totais (PT; *Lowry*) e a atividade de fosfatase alcalina (ALP; timolftaleína) foram investigadas aos 14 e 21 dias. A formação de matriz mineralizada (*Alizarin Red*) foi avaliada em 21 dias. Os dados foram analisados com ANOVA a um ou dois fatores, complementada por Tukey, Games-Howell ou Sidak ( $\alpha=0,05$ ). Todas as formulações originaram fibras variando entre 600 a 900 nm de diâmetro, com disposição aleatória. A identificação de cálcio e fósforo nas fibras foi concentração-dependente, confirmando a incorporação de nHA ao polímero. Concentrações mais altas de nHA tornaram as superfícies das nanofibras irregulares. PCL+0,5% nHA ampliou o diâmetro da nanofibra, enquanto PCL+2%nHA aumentou os espaços interfibrilares. PCL+1%nHA ou PCL+2%nHA promoveram significativa liberação de cálcio e fosfato, porém a modulação de pH não excedeu o valor 8,0. A viabilidade de HDPCs não foi afetada pela adição de nHA, enquanto adesão/espalhamento celular foram favorecidas. A expressão de DSPP e DMP1 foi regulada positivamente em 14 dias, e COL1A1, ALPL e DMP1 em 21 dias pelas formulações PCL+1%nHA e PCL+2%nHA. Maior quantidade de proteínas foi identificada em *scaffolds* contendo nHA no período mais tardio e a presença de nHA aumentou a atividade de ALP em 14 e 21 dias. A formação de matriz mineralizada foi dependente da concentração de nHA, cerca de 9x maior para PCL+2%nHA em comparação ao controle. Em conclusão, *scaffolds* nanofibrilares de PCL incorporados com nHA foram citocompatíveis, estimularam a adesão, espalhamento, proliferação e o potencial odontogênico de HDPCs. A formulação PCL+2%nHA é uma estratégia bioativa de engenharia tecidual para terapia pulpar vital.

**Palavras – chave:** Nanofibras. Engenharia tecidual. Biomineralização. Capeamento da polpa dentária. Expressão gênica.

Soares IPM. Polycaprolactone/nanohydroxyapatite nanofibrous scaffolds for the dentin-pulp complex regeneration: synthesis, characterization, and evaluation on human dental pulp cells [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## **ABSTRACT**

Targeting a cytocompatible and bioactive therapy for the application on the exposed pulp tissue, this study developed and characterized polycaprolactone (PCL) nanofibrous scaffolds incorporated with nano-hydroxyapatite (nHA) and evaluated the response of human dental pulp cells (HDPCs) seeded on their surface. PCL-based solutions (10% w/v in chloroform/dimethylformamide) were incorporated or not with nHA (0.5; 1.0; or 2.0 % w/v) and electrospun into nanofibrous scaffolds. The scaffolds were characterized for morphology (SEM), composition (EDS), solubility (mass change), release of calcium/phosphate (spectrophotometry), and pH medium modulation. HDPCs were cultured on the surface of the scaffolds and evaluated for cell viability (Live/Dead and alamarBlue) and adhesion/spreading (F-actin) over time. The expression of COL1A1, ALPL, DSPP, and DMP1 genes (RT-qPCR), total protein synthesis (TP; Lowry), and alkaline phosphatase activity (ALP; thymolphthalein assay) were investigated at 14 and 21 days. The formation of a mineralized matrix (Alizarin Red) was assessed at 21 days. Data were analyzed with one- or two-way ANOVA complemented with Tukey, Games-Howell, or Sidak post-hocs ( $\alpha=0.05$ ). All formulations generated fibers ranging from 600 to 900 nm in diameter, with random arrangement. The incorporation of nHA into the nanofibers was dose-dependent. Higher nHA concentrations roughened nanofibers surfaces. PCL+0.5%nHA enlarged fiber diameter whereas PCL+2%nHA increased interfibrillar spaces. PCL+1%nHA or PCL+2%nHA promoted greater release of calcium and phosphate, but the medium pH was maintained below 8.0. HDPCs viability was not affected by the addition of nHA, while adhesion/spreading were favored. The expression of DSPP and DMP1 was upregulated in 14 days, and COL1A1, ALPL, and DMP1 in 21 days by the PCL+1%nHA and PCL+2%nHA formulations. The incorporation of nHA promoted higher protein synthesis and increased ALP activity. The formation of a mineralized matrix was concentration-dependent, about 9x higher for the PCL+2%nHA in comparison to the control. In conclusion, nanofibrous PCL scaffolds incorporated with nHA were cytocompatible, stimulated adhesion, spreading, proliferation, and the odontogenic potential of HDPCs. The PCL+2%nHA formulation is a bioactive tissue engineering strategy for vital pulp therapy.

**Keywords:** Nanofibers. Tissue engineering. Biomineralization. Dental pulp capping. Gene expression.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	PROPOSIÇÃO .....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA .....	19
3.1	Complexo Dentino-Pulpar: Estrutura e Dinâmica .....	19
3.2	Terapia Pulpar Vital .....	21
3.3	Engenharia Tecidual e Regeneração do Complexo Dentino-Pulpar .....	24
3.4	<i>Scaffold</i> Nanofibrilar para Aplicação sobre a Polpa Exposta .....	26
3.5	Funcionalização de <i>Scaffolds</i> com Fases Minerai s .....	31
4	MATERIAL E MÉTODO .....	34
4.1	Síntese e Caracterização Físico-Química dos <i>Scaffolds</i> .....	34
4.1.1	Síntese de nanofibras .....	34
4.1.2	Caracterização morfológica e da incorporação de nHA .....	35
4.1.3	Confecção dos <i>scaffolds</i> nanofibrilares .....	36
4.1.4	Solubilidade, modulação de pH do meio, liberação de cálcio e fosfato .....	36
4.2	Avaliação da Citocompatibilidade e Resposta de Células da Polpa Dental Humana (HDPCs) Semeadas em Contato com os <i>Scaffolds</i> .....	38
4.2.1	Estabelecimento e caracterização da cultura primária .....	38
4.2.2	Cultura de HDPCs sobre a superfície dos <i>scaffolds</i> .....	40
4.2.3	Avaliação da citocompatibilidade .....	42
4.2.4	Regulação da expressão gênica .....	43
4.2.5	Dosagem de proteínas totais e atividade de fosfatase alcalina .....	44
4.2.6	Formação de matriz mineralizada .....	45
4.3	Análise dos Dados .....	45
5	RESULTADOS .....	47
5.1	Síntese e Caracterização Físico-Química dos <i>Scaffolds</i> .....	47
5.2	Avaliação Biológica dos <i>Scaffolds</i> com HDPCs.....	52
6	DISCUSSÃO .....	61

<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>77</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Quando a integridade estrutural da dentina é rompida, o tecido pulpar vital exposto deve ser submetido a uma Terapia Pulpar Vital (TPV), cujo objetivo é estimular o potencial reparador deste tecido conjuntivo altamente especializado para produzir dentina reparadora<sup>1</sup>. Atualmente, os materiais de escolha para aplicação direta sobre o tecido pulpar são baseados na liberação de hidróxido de cálcio<sup>2,3</sup>. Entretanto, a elevada concentração de íons hidroxila liberada por esses materiais resulta em efeitos indesejáveis, incluindo morte celular e perda tecidual, reação inflamatória local exacerbada, formação de uma zona necrótica superficial e mineralização distrófica decorrente de necrose<sup>2-4</sup>.

O avanço da engenharia tecidual abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de *scaffolds* como estratégia regenerativa para manter a vitalidade e restabelecer a funcionalidade tecidual de forma bioativa<sup>5-7</sup>. Considerando a aplicação dessa estratégia para a regeneração do complexo dentino-pulpar, *scaffolds* devem permitir a migração e abrigar células multipotentes residentes na polpa, estimulando a proliferação e a expressão do fenótipo odontoblástico para promover a formação de uma barreira mineralizada semelhante à dentina<sup>5,6,8,9</sup>. Para tanto, os materiais utilizados devem, idealmente, ser capazes de replicar as características da matriz extracelular (MEC) nativa para sustentar e modular a função celular<sup>10</sup>.

A eletrofiação (ou *electrospinning*) tem sido destacada como uma técnica favorável para criar, a partir de soluções poliméricas, fibras sólidas majoritariamente na escala nanométrica (nanofibras) altamente personalizadas, mimetizando o microambiente da MEC<sup>10,11</sup>. Assim, a característica estrutural de fibras interconectadas observada em *scaffolds* obtidos por eletrofiação tem mostrado estimular a interação celular ativa, sendo promissora para aplicação em processos regenerativos<sup>8,10,12</sup>.

Biocompatibilidade, biodegradabilidade, reprodutibilidade e processabilidade são propriedades indispensáveis para polímeros usados em engenharia tecidual<sup>13</sup>. Policaprolactona (PCL) é um polímero sintético de baixo custo que apresenta tais características<sup>14</sup>. Facilmente processável por eletrofiação, PCL apresenta aprovação de agências reguladoras para aplicações

médicas e tem mostrado permitir a regeneração de diversos tecidos, além de ser utilizado como veículo biocompatível para sistemas de liberação controlada de fármacos em função de sua baixa taxa de degradação<sup>14-16</sup>. Essa última característica o torna interessante para aplicação como material de capeamento pulpar direto, visto que pode atuar como barreira física duradoura, reduzindo a difusão de componentes tóxicos lixiviados dos materiais restauradores para o tecido pulpar. Apesar da conhecida compatibilidade celular, o baixo grau de hidrofília do PCL não favorece interações celulares, sendo necessário melhorar as propriedades de superfície para aplicações médicas<sup>14,17</sup>. Assim, a incorporação de outros agentes tem sido investigada como estratégia para facilitar e induzir os processos de adesão, proliferação celular e expressão de fenótipos específicos para formar o tecido desejado<sup>17-20</sup>.

As cerâmicas de fosfato de cálcio (CFC), também conhecidas como biocerâmicas, têm se destacado na regeneração óssea pelas propriedades de osteocondução e osteoindução<sup>21,22</sup>. Dentre as biocerâmicas, a nano-hidroxiapatita (nHA) foi amplamente difundida na engenharia de tecidos mineralizados por apresentar alta similaridade com estruturas originais, sendo biocompatível sem causar reações inflamatórias<sup>21,23</sup>. Outras propriedades favoráveis incluem baixa taxa de degradação, adsorção de proteínas à sua estrutura e liberação local controlada de íons cálcio e fosfato que atuam em processos de diferenciação celular e biomineralização<sup>21,23-26</sup>.

Como a friabilidade, dificuldade de adaptação e manutenção das nanopartículas isoladas no local da injúria tecidual limitam sua utilização, a incorporação de nHA à matriz polimérica de PCL foi sugerida como estratégia para confecção de *scaffolds* bioativos para a regeneração óssea<sup>21,23</sup>. *Scaffolds* de PCL incorporados com nHA têm demonstrado resultados promissores para formação de tecido ósseo por células de osteossarcoma humano (SaOS-2)<sup>27</sup>, pré-osteoblastos derivados da calvária de camundongos (MC3T3-E1)<sup>28</sup>, células-tronco mesenquimais de camundongos (mMSC)<sup>29</sup>, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (BMSC)<sup>30</sup>, derivadas do tecido adiposo humano (ADSC)<sup>30</sup>, derivadas da polpa dental humana (DPSC)<sup>30</sup>, e células-tronco isoladas da polpa de camundongo (mDPSC)<sup>31</sup>.

Dessa maneira, os resultados favoráveis obtidos para a regeneração óssea instigam a utilização dessa associação para aplicações voltadas à regeneração do complexo dentino-pulpar. Até o momento, poucos estudos investigaram a resposta das células pulpares ao PCL puro ou associado à hidroxiapatita para a formação de tecido dentinário<sup>31,32</sup>. Recentemente, foi demonstrado que membranas de PCL incorporadas com hidroxiapatita foram capazes de estimular a expressão do fenótipo odontoblástico por células mesenquimais indiferenciadas isoladas de dentes humanos com diagnóstico de pulpite irreversível (IDPSCs, *inflamed dental pulp stem cells*)<sup>32</sup>. Uma vez que os materiais atuais disponíveis para VPT ainda carecem de propriedades ideais, a investigação de novas estratégias regenerativas é necessária para induzir a formação fisiológica de dentina de forma previsível e limitar a necrose pulpar<sup>33,34</sup>. Assim, este estudo investigou *scaffolds* nanofibrilares de PCL incorporados com nHA para funcionar um material citocompatível, com propriedades físico-químicas adequadas que estimulem o potencial regenerativo intrínseco do tecido pulpar mediado por células indiferenciadas residentes no tecido sem causar danos indesejáveis.

## 7 CONCLUSÃO

A incorporação de nano-hidroxiapatita a nanofibras de policaprolactona permitiu a produção de *scaffolds* citocompatíveis e com propriedades físico-químicas favoráveis à adesão, proliferação e diferenciação odontogênica de células pulparens humanas. *Scaffolds* incorporados com 2% da nanopartícula apresentaram maior efeito sobre a expressão do fenótipo odontoblástico e deposição de matriz mineralizada por células da polpa dental humana.

## REFERÊNCIAS\*

1. 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.
2. Komabayashi T, Zhu Q, Eberhart R, Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dent Mater J.* 2016; 35(1): 1-12.
3. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct pulp capping with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: a meta-analysis. *J Endod.* 2015; 41(9): 1412-7.
4. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985; 64: 541-8.
5. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019; 13(1): 58-75.
6. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2014; 40 (Suppl 4): 41-5.
7. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater.* 2012; 28(4): 341-8.
8. Bottino MC, Pankajakshan D, Nör JE. Advanced scaffolds for dental pulp and periodontal regeneration. *Dent Clin North Am.* 2017; 61(4): 689-711.
9. 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.
10. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res.* 2012; 91(3): 227-34.
11. Castaño O, Eltohamy M, Kim HW. Electrospinning technology in tissue regeneration. *Methods Mol Biol.* 2012; 811:127-40.
12. Diana R, Ardhani R, Kristanti Y, Santosa P. Dental pulp stem cells response on the nanotopography of scaffold to regenerate dentin-pulp complex tissue. *Regen Ther.* 2020; 15 (7): 243-50.

---

\* 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. 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): 47-58.
14. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - polycaprolactone in the 21st century. *Prog Pol Sci.* 2010; 35(10): 1217-56.
15. Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Control Release.* 2015; 219(10): 119-28.
16. Siddiqui N, Asawa S, Birru B, Baadhe R, Rao S. PCL-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. *Mol Biotechnol.* 2018; 60(7): 506-32.
17. 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.
18. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: review of literature. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020; 10(1): 381-8.
19. Mondal D, Griffith M, Venkatraman SS. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2016; 65(5): 255-65.
20. Kim GH, Park YD, Lee SY, El-Fiqi A, Kim JJ, Lee EJ et al. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *J Biomater Appl.* 2015; 29(6): 854-66.
21. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019; 23 (4): 1-11.
22. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013; 9(9): 8037-45.
23. Tuukkanen J, Nakamura M. Hydroxyapatite as a nanomaterial for advanced tissue engineering and drug therapy. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(26): 3786-93.
24. Liang W, Ding P, Li G, Lu E, Zhao Z. Hydroxyapatite nanoparticles facilitate osteoblast differentiation and bone formation within sagittal suture during expansion in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2021; 15(1): 905-17.
25. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg ED, et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(1): 281-91.

26. Salaszyk RM, Klees RF, Williams WA, Boskey A, Plopper GE. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313(1): 22-37.
27. Wutticharoenmongkol P, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P. Novel bone scaffolds of electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006; 6(2): 514-22.
28. Wutticharoenmongkol P, Pavasant P, Supaphol P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2007; 8(8): 2602-10.
29. Mohamadyar-Toupkanlou F, Vasheghani-Farahani E, Bakhshandeh B, Soleimani M, Ardeshiryajimi A. In vitro and in vivo investigations on fibronectin coated and hydroxyapatite incorporated scaffolds. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015; 61(4): 1-7.
30. Chuenjitkuntaworn B, Osathanon T, Nowwarote N, Supaphol P, Pavasant P. The efficacy of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2016; 104(1): 264-71.
31. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 93(1): 247-57.
32. Gopinath VK, Soumya S, Chakrapani VY, Kumar TSS. Odontogenic differentiation of inflamed dental pulp stem cells (IDPSCs) on polycaprolactone (PCL) nanofiber blended with hydroxyapatite. *Dent Mater J*. 2021; 40(2): 312-21.
33. 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.
34. Yoshida S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Insight into the role of dental pulp stem cells in regenerative therapy. *Biology (Basel)*. 2020; 160(9): 1-24.
35. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3(1): 711-35.
36. Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1995; 39(1): 51-68.
37. Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(9): 1165-75.

38. Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol.* 2005; 242: 121-56.
39. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007; 18(5): 444-8.
40. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013; 92(9): 765-72.
41. Schour I, Hoffman MM. Studies in tooth development: II. The rate of apposition of enamel and dentine in man and other mammals. *J Dent Res.* 1939; 18: 161-75.
42. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2): 104-33.
43. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5): 679-728.
44. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(2): 109-21.
45. Smith JG, Smith AJ, Shelton RM, Cooper PR. Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp Cell Res.* 2012; 318(18): 2397-406.
46. Cohen BD, Combe EC. Development of new adhesive pulp capping materials. *Dent Update.* 1994; 21(2): 57-62.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spångberg LS, Tay FR. Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *J Dent.* 2014; 42(9): 1156-70.
51. Ronchetti I, Boraldi F, Annovi G, Cianciulli P, Quaglino D. Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. *Front Genet.* 2013; 4: 22.



52. 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.
53. Taira Y, Shinkai K, Suzuki M, Kato C, Katoh Y. Direct pulp capping effect with experimentally developed adhesive resin systems containing reparative dentin-promoting agents on rat pulp: mixed amounts of additives and their effect on wound healing. *Odontology.* 2011; 99(2): 135-47.
54. Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent.* 1996; 21(1): 4-11.
55. Cushley S, Duncan HF, Lappin MJ, Chua P, Elamin AD, Clarke M, et al. Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021; 54(4): 556-71.
56. Ioannidis K, Mistakidis I, Beltes P, Karagiannis V. Spectrophotometric analysis of coronal discoloration induced by grey and white MTA. *Int Endod J.* 2013; 46(2): 137-44.
57. Zhu C, Ju B, Ni R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(10): 17055-60.
58. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453: 314-21.
59. Huang GT, Liu J, Zhu X, Yu Z, Li D, Chen CA, et al. Pulp/dentin regeneration: it should be complicated. *J Endod.* 2020; 46(9S): 128-34.
60. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260(5110): 920-6.
61. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 97(25): 13625-30.
62. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med.* 2009; 4(5): 697-707.
63. 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.
64. Chakka LRJ, Vislisel J, Vidal CMP, Biz MT, K Salem A, Cavalcanti BN. Application of BMP-2/FGF-2 gene-activated scaffolds for dental pulp capping. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(12): 4427-37.

65. 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.
66. Ekblom P, Vestweber D, Kemler R. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. *Annu Rev Cell Biol*. 1986; 2: 27-47.
67. 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.
68. Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*. 2007; 28(2): 335-43.
69. Cassiano FB, Soares DG, Bordini EAF, Anovazzi G, Hebling J, Costa CAS. Simvastatin-enriched macro-porous chitosan-calcium-aluminate scaffold for mineralized tissue regeneration. *Braz Dent J*. 2020; 31(4): 385-91.
70. Bordini EAF, Cassiano FB, Silva ISP, Usberti FR, Anovazzi G, Pacheco LE, et al. Synergistic potential of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and calcium-aluminate-chitosan scaffolds with dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2020; 24(2): 663-74.
71. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Silva Leite MLA, Basso FG, et al. Biological analysis of simvastatin-releasing chitosan scaffold as a cell-free system for pulp-dentin regeneration. *J Endod*. 2018; 44(6): 971-6.
72. Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, Basso FG, Huck C, Hebling J, et al. 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.
73. Christen MO, Vercesi F. Polycaprolactone: how a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020; 13(20): 31-48.
74. Leite ML, Usberti FR, Zuta UO, 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.
75. Song G, Habibovic P, Bao C, Hu J, van Blitterswijk CA, Yuan H, et al. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials*. 2013; 34(9): 2167-76.
76. Klein CP, de Blicke-Hogervorst JM, Wolke JG, de Groot K. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials*. 1990; 11(7): 509-12.

77. Gustavsson J, Ginebra MP, Engel E, Planell J. Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomater.* 2011; 7(12): 4242-52.
78. Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell-materials interactions of polarized hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2009; 5(6): 2178-88.
79. Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A, Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006; 47(1):10-9.
80. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials.* 2001; 22(1): 87-96.
81. 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.
82. Liu YK, Lu QZ, Pei R, Ji HJ, Zhou GS, Zhao XL, et al. The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2009; 4(2): 025004.
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. Wang R, Hu H, Guo J, Wang Q, Cao J, Wang H, et al. Nano-hydroxyapatite modulates osteoblast differentiation through autophagy induction via mTOR signaling pathway. *J Biomed Nanotechnol.* 2019; 15(2): 405-15.
85. Sunandhakumari VJ, Vidhyadharan AK, Alim A, Kumar D, Ravindran J, Krishna A, et al. Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass/nano hydroxyapatite reinforced electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite membranes for guided tissue regeneration. *Bioengineering (Basel).* 2018; 5(3): 54.
86. Hassan MI, Sultana N. Characterization, drug loading and antibacterial activity of nanohydroxyapatite/polycaprolactone (nHA/PCL) electrospun membrane. *3 Biotech.* 2017; 7(4): 249.
87. 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.

88. Hokmabad VR, Davaran S, Aghazadeh M, Alizadeh E, Salehi R, Ramazani A. A comparison of the effects of silica and hydroxyapatite nanoparticles on poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethyleneglycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med*. 2018; 15(6): 735-50.
89. Gittings JP, Bowen CR, Dent AC, Turner IG, Baxter FR, Chaudhuri JB. Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. *Acta Biomater*. 2009; 5(2): 743-54.
90. Thomas V, Jagani S, Johnson K, Jose MV, Dean DR, Vohra YK, et al. Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006; 6(2): 487-93.
91. Guarino V, Taddei P, Di Foggia M, Fagnano C, Ciapetti G, Ambrosio L. The influence of hydroxyapatite particles on in vitro degradation behavior of poly epsilon-caprolactone-based composite scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(11): 3655-68.
92. Salerno A, Fernández-Gutiérrez M, del Barrio JSR, Pascual CD. Macroporous and nanometre scale fibrous PLA and PLA–HA composite scaffolds fabricated by a bio safe strategy. *RSC Adv*. 2014; 4: 61491-502.
93. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J*. 2017; 50(8): 780-9.
94. Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 1;67(2): 531-7.
95. Lee JH, Rim NG, Jung HS, Shin H. Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co-(glycolic acid)] and hydroxyapatite. *Macromol Biosci*. 2010; 10(2): 173-82.
96. Lee KW, Wang S, Yaszemski MJ, Lu L. Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites. *Biomaterials*. 2008; 29(19): 2839-48.
97. Shitole AA, Raut PW, Sharma N, Giram P, Khandwekar AP, Garnaik B. Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO nanofibers as potential biomaterials for bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2019; 30(5): 51.

98. Li N, Wu G, Yao H, Tang R, Gu X, Tu C. Size effect of nano-hydroxyapatite on proliferation of odontoblast-like MDPC-23 cells. *Dent Mater J.* 2019; 38(4): 534-9.
99. Mohamed DA, Fayyad DM. The effect of different bioactive materials on the odontogenic differentiation potential of dental pulp stem cells using two different culture mediums. *Tanta Dent J.* 2017; 14(3): 120-8.