

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOCiência

Débora Carajiliascov Ferraraz

**CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS
HUMANOS CULTIVADAS EM ARCABOUÇO DE DENTINA
PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL**

São Bernardo do Campo, SP

2020

DÉBORA CARAJILIASCOV FERRARAZ

**CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS
CULTIVADAS EM ARCABOUÇO DE DENTINA PARA REGENERAÇÃO
TECIDUAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Métodos aplicados em Sistemas Complexos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Aparecida da Ana

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Bertachini Lombello

São Bernardo do Campo, SP

2020

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ferraraz, Débora Carajiliascov

Células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos cultivadas
em arcabouço de dentina para regeneração tecidual / Débora
Carajiliascov Ferraraz. — 2020.

130 fls. : il.

Orientadora: Patrícia Aparecida da Ana

Tese (Doutorado) — Universidade Federal do ABC, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnociência, São Bernardo do Campo, 2020.

1. Células-tronco. 2. Dente decíduo. 3. Dentina. 4. Diferenciação
celular. 5. Engenharia de tecidos. I. Ana, Patrícia Aparecida da. II.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência, 2020. III. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) orientador(a).

São Bernardo do Campo/SP 10 de abril de 2020

Assinatura do(a) autor(a):

Debora S. Ferraz

Assinatura do(a) orientador(a):

[Assinatura]



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata, DÉBORA CARAJILIASCOV FERRARAZ realizada em 10 de Fevereiro de 2020:


Prof.(a) **ARNALDO RODRIGUES DOS SANTOS JUNIOR**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC


Prof.(a) **CHRISTIANE PINTO DAVI**


Prof.(a) **CHRISTIANE RIBEIRO**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC


Prof.(a) **ILKA TIEMY KATO PRATES**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) **ANA CAROLINA SANTOS DE SOUZA GALVAO**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) **DÉBORA LILIANE DE SOUZA RENÓ**

Prof.(a) **FERNANDA DIAS DA SILVA**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) **MÔNICA HELENA MONTEIRO DO NASCIMENTO**


Prof.(a) **PATRICIA APARECIDA DA ANA**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

* Por ausência do membro titular, foi substituído pelo membro suplente descrito acima: nome completo, instituição e assinatura

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

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as oportunidades de aprendizado.

Aos meus amados pais, Orlando e Márcia, que sempre me ensinaram pelo saber, pelo exemplo e pelo amor.

Ao meu irmão, Marcelo, minha cunhada, Daniela e minha sobrinha, Maya, pelo carinho.

À minha amada cachorrinha Atena, por todos os maravilhosos momentos que passamos juntas.

Às minhas cachorrinhas Susi e Lua, por toda a alegria.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Patrícia Aparecida da Ana pela oportunidade de aprendizado e orientação no desenvolvimento do projeto.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Christiane Bertachini Lombello pela orientação e por todos os ensinamentos ao longo dos anos.

Aos meus amigos, Mônica Helena do Nascimento, Felipe Ambrósio e Anand Masson, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas Christiane Davi, Daniela Figueredo, Dara Senciani Mendes, Letícia Conconi Silva, Matheus del Valle e Laurent Rodrigues Rezende e aos professores Carolina Benetti e Ricardo Lombello pelas contribuições oferecidas.

Às Centrais Experimentais Multiusuário (CEMs) da Universidade Federal do ABC pelo apoio experimental.

Aos técnicos dos laboratórios didáticos e multiusuários da Universidade Federal do ABC por toda colaboração nos testes realizados.

À empresa Criogênese, Nelson Tatsui, Márcia Camargo, Vanderley Espirandelli, Thiago Sheguti e Jackeline Katayose pelas contribuições e auxílio na avaliação por citometria de fluxo.

À Universidade Metodista de São Paulo pela cooperação no desenvolvimento do estudo.

Às professoras Sucena Matuk, Maria Christina e Renata Pilli Jóias, pela disponibilidade e assistência na pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo auxílio na esterilização das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e auxílio financeiro (PROCAD-CAPES, 88881.068505/2014-01) concedidos.

Ao Instituto Nacional de Fotônica (INCT-INFO, 465763/2014-6) pelo auxílio financeiro.

Aos meus familiares, amigos e colegas da Universidade pelo incentivo, carinho e colaboração.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade.

Aos professores da Universidade Federal do ABC, que contribuíram com minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do ABC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo ensino de qualidade e por todo aprendizado.

A todos vocês, meu muito obrigada!

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar que apresenta três componentes essenciais: células, arcabouço e fatores indutores. Na polpa dentária são encontradas as células-tronco, bastante estudadas na área médica. A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que vem despertando grande interesse para utilização como arcabouço, pois apresenta boa disponibilidade, biocompatibilidade e presença de fatores indutores. Contudo, é necessário o estudo do seu preparo e de como este afeta suas características, para sua utilização clínica, visando a regeneração tecidual óssea. Desta forma, este estudo avaliou a obtenção e caracterização de células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED) para utilização da dentina humana como arcabouço. As SHED foram obtidas pelo cultivo de explante, com e sem a utilização da enzima tripsina, sendo caracterizadas pela adesão, morfologia, diferenciação em diferentes linhagens celulares e por citometria de fluxo. Os arcabouços de dentina foram obtidos de dentes molares humanos. Após o preparo, as dentinas foram separadas em quatro grupos experimentais: controle (sem tratamento), tratamento 1 (EDTA), tratamento 2 (EDTA e ácido cítrico) e tratamento 3 (HCl). Para caracterização dos arcabouços foram realizadas avaliações da perda de massa, estrutura, composição química, resistência mecânica e citotoxicidade. Em seguida, as SHED foram inoculadas sobre as dentinas para análise da interação células-arcabouço. O procedimento enzimático auxiliou na liberação das SHED, as quais apresentaram as características das células-tronco mesenquimais. Os tratamentos na dentina contribuíram para a desobstrução dos túbulos dentinários, remoção parcialmente dos minerais e exposição da parte orgânica da matriz. O tratamento 3 foi o que ocasionou maior perda da porção mineral, maior perda de massa, menor resistência à compressão e diminuição na densidade celular. Na avaliação morfológica das células em contato com os arcabouços, foi visualizado que as SHED se desenvolveram normalmente no grupo controle e nas amostras submetidas aos tratamentos 1 e 2. Deste modo, as dentinas dos tratamentos 1 e 2 apresentam características propícias para o cultivo e diferenciação das SHED. Portanto, este tecido possui amplo potencial para ser empregado como arcabouço no tratamento de pequenas perdas ósseas.

Palavras-chave: Células-tronco. Dente decíduo. Dentina. Diferenciação celular. Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field that presents three essential components: cells, scaffold and inducing factors. In the dental pulp are found the stem cells, which have been extensively studied in the medical field. Dentin is a mineralized connective tissue that has aroused great interest for use as a scaffold, as it has good availability, biocompatibility and presents inducing factors. However, it is necessary to study its preparation and how it affects its characteristics, for its clinical use, aiming at bone tissue regeneration. Thus, this study evaluated the obtaining and characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) for the use of human dentin as a scaffold. SHED were obtained by explant culture, with and without the use of the enzyme trypsin, being characterized by adhesion, morphology, differentiation in different cell lines and by flow cytometry. The dentine scaffolds were obtained from human molar teeth. After preparation, the dentin was separated into four experimental groups: control (without treatment), treatment 1 (EDTA), treatment 2 (EDTA and citric acid) and treatment 3 (HCl). To characterize the scaffolds, mass loss, structure, chemical composition, mechanical resistance and cytotoxicity were evaluated. Afterwards, the cells were inoculated on the dentin for analysis of the cell-scaffold interaction. The enzymatic procedure helped to release SHED, which showed the characteristics of mesenchymal stem cells. Dentin treatments contributed to unblocking the dentinal tubules, partial removal of minerals and exposure of the organic part of the matrix. Treatment 3 was the one that caused the greatest loss of the mineral portion, greater loss of mass, less resistance to compression and decrease in cell density. In the morphological evaluation of the cells in contact with the scaffolds, it was observed that the SHED developed normally in the control group and in the samples submitted to treatments 1 and 2. Thus, the dentins from treatments 1 and 2 present characteristics that are suitable for cultivation and differentiation of SHED. Therefore, this tissue has ample potential to be used as a scaffold in the treatment of small bone losses.

Keyword: Cell Differentiation. Dentin. Deciduous Teeth. Stem Cells. Tissue Engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura esquemática de um corte sagital de um dente molar humano.....	36
Figura 2 - Esquema das etapas da tese.....	45
Figura 3 - Esquemas com os cortes realizados nos dentes para a obtenção das frações de dentina (A, B e C). As linhas tracejadas indicam as regiões dos cortes. .	51
Figura 4 - Imagem ilustrativa do ensaio de compressão das amostras de dentina (F: força da carga aplicada).....	54
Figura 5 - Corte dos dentes.....	57
Figura 6 - Tecido pulpar recém-extraído. A seta indica a polpa dentária.	58
Figura 7 - Placa de cultura de seis poços com as polpas dentárias. As setas indicam as polpas.....	58
Figura 8 - Polpa dentária recém-extraída de dente decíduo, observada por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1500x (a); 2000x (b); 2000x c) e 3000x (d).	59
Figura 9 – Polpa dentária após 35 dias de cultura, sem processamento enzimático prévio, observada por microscopia eletrônica de varredura. As células na superfície do tecido estão evidenciadas por setas brancas. Magnificação original: 1000x (a); 1000x (b); 2000x (c) e 3000x (d).	60
Figura 10 – Polpa dentária após 35 dias de cultura, tratada com tripsina, observada por microscopia eletrônica de varredura. As células na superfície do tecido estão evidenciadas por setas brancas. Magnificação original: 1000x (a); 1500x (a); 2000x (c) e 3000x (d).....	61
Figura 11 - Células liberadas das polpas tratadas com tripsina (a). Células liberadas da polpa sem digestão enzimática (b). Observação por microscopia de luz com contraste de fase. Magnificação original 100x (a e b).	62
Figura 12 - Células liberadas pela polpa dentária na passagem 0. Observação por microscopia de luz com contraste de fase. Magnificação original 200x (a, b, c e d).	63
Figura 13 - Células observadas por microscopia de luz com contraste de fase. Células passagem 0 (a, b e c). Células passagem 1 (d, e e f). Células passagem 2 (g, h e i). Magnificação original 100x (a, d, g e h), 200x (b, c, e, f e i).	64

Figura 14 - Células observadas por microscopia de fluorescência, após 3 dias de cultura. Magnificação original 100x (a), 200x (b), 400x (c e d). Células coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).....	65
Figura 15 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 2 horas da inoculação (a, b, c, d, e e f). Magnificação original: 5000x (a), 4500x (b), 4000x (c), 3000x (d), 3000x (e), 2000x (f).	66
Figura 16 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 3 dias da inoculação (a, b, c e d). As setas indicam o crescimento em multicamadas (c) e divisão celular (d). Magnificação original: 500x (a, b), 1000x (c, d).....	67
Figura 17 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 3 dias da inoculação (a, b, c e d). As setas indicam as estruturas protrusivas das células (a e b), uma região de contato entre células (c) e o núcleo (d). Magnificação original: 5000x (a e d), 3000x (b e c).	68
Figura 18 - Citometria de fluxo das células da polpa obtidas do tratamento com tripsina.....	69
Figura 19 - Diferenciação osteogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação osteogênica (b, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Células coradas vermelho de alizarina. Magnificação original 200x (a, b, c e d).....	70
Figura 20 - Diferenciação adipogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação adipogênica (b, c e d). As setas evidenciam os lipídios intracelulares (b, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Células coradas com Oil red O. Magnificação original 200x (a, b, c e d).	71
Figura 21 - Diferenciação condrogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a e c). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação condrogênica (b e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase (a, b, c e d). Células coradas com ácido periódico-Schiff (a e b) e toluidina (c e d). Magnificação original 200x (a, b, c e d).	72
Figura 22 - Cariótipos representativos das células em cultura (a, b, c e d).....	73
Figura 23 - Etapas do preparo do arcabouço de dentina.	74

Figura 24 - Gráfico dos espectros médios de ATR/FTIR, na região compreendida entre 4000-700 cm^{-1} , das amostras de dentinas antes e depois da esterilização, com a identificação do número de onda dos principais grupos funcionais (n=8).	75
Figura 25 - Gráfico dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, ν_3 carbonato, ν_2 carbonato e OH^- , normalizados pela área da banda do fosfato, obtidos antes e depois da esterilização das amostras de dentina (n=8). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes dentro do mesmo componente químico, segundo o teste t de Student pareado. As barras evidenciam o desvio-padrão.....	77
Figura 26 – Gráfico das médias das porcentagens de perda de massa das amostras de dentina (n=5). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes em comparação com o controle, segundo o teste Dunn. As barras evidenciam desvio-padrão.....	78
Figura 27 – Dentina sem tratamento (controle), observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas brancas evidenciam resíduos depositados na superfície da dentina e as pretas os túbulos parcialmente obstruídos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).	79
Figura 28 – Dentina após tratamento 1, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).....	80
Figura 29 – Dentina após tratamento 2, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).....	81
Figura 30 – Dentina tratamento 3, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x.	82
Figura 31 - Gráfico dos espectros médios de ATR/FTIR, na região compreendida entre 4000-700 cm^{-1} , das amostras de dentina testadas, com a identificação do número de onda dos principais grupos funcionais (n=19).	83

Figura 32 - Gráfico dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, ν_3 carbonato, ν_2 carbonato e OH^- , normalizados pela área da banda do fosfato, obtidos das amostras de dentina testadas (n=19). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes dentro do mesmo componente químico, segundo o teste Dunn.	84
Figura 33 - Gráfico da tensão pela deformação das amostras de dentina (n=2), pelo ensaio de compressão. Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes para os valores de limite de resistência à compressão, segundo o teste de Tukey.....	85
Figura 34 – Amostras de dentina imersas em meio de cultura e mantidas na estufa a 37 °C, durante 24 horas.	86
Figura 35 - Teste de citotoxicidade. Controle negativo (placa de cultura, a e b) e controle positivo (fenol 0,25%, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Magnificação original 100x (a e c) e 200x (b e d).	87
Figura 36 - Teste de citotoxicidade. Cultura com extrato das dentinas sem tratamento (a e b), tratamento 1 (c e d), tratamento 2 (e e f) e tratamento 3 (g e h). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Magnificação original 100x (a, c, e e g) e 200x (b, d, f e h).	88
Figura 37 - Gráfico das médias de viabilidade celular do controle negativo, controle positivo (fenol 0,25%) e das culturas com os extratos das dentinas testadas (n=5). A linha pontilhada vermelha demarca o valor de viabilidade de 70% do controle negativo. Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes em comparação com os controles negativo e positivo, segundo o teste de Tukey.	89
Figura 38 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a e b). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2500x (c) e 4000x (d).....	90
Figura 39 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células (a e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....	91

Figura 40 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com 21 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).	92
Figura 41 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1091x (b), 2000x (c) e 4000x (d).	93
Figura 42 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células e as setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....	94
Figura 43 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com 21 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....	95
Figura 44 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).	96
Figura 45 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células e as setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....	97
Figura 46 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....	98
Figura 47 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e	

lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).

.....99

Figura 48 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com 3 dias de cultura.

Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas indicam as células (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d).

Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....100

Figura 49 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com 21 dias de cultura.

Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1.

Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Números de onda evidenciados nos espectros obtidos para as amostras de dentina através da análise de ATR/FTIR e suas interpretações e referências.....76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

± - Desvio padrão

°C - Grau Celsius

% - Por cento

ATR - Reflexão total atenuada

μL - Microlitro

μm – Micrometro

α-MEM – alfa meio essencial mínimo

ANOVA - Análise de variância

BMP - Proteínas morfogenéticas ósseas

BSP - Sialoproteína óssea

CAAE - Certificado de apresentação para apreciação ética

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

cm² - Centímetro quadrado

CO₂ - Dióxido de carbono

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMP1- Proteína da matriz dentinária 1

DPSC - Células-tronco da polpa dentária

DSP - Sialoproteína dentinária

DSPP - Sialofosfoproteína dentinária

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

et al. - E outros

etc. - E assim por diante

FGF - Fator de crescimento fibroblástico

FTIR - Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

g - Grama

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Kg - Quilograma

kGy - QuiloGray

mg - Miligrama

mL – Mililitro

nm - Nanômetro

MEPE - Fosfoglicoproteína extracelular da matriz

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PAS - Ácido periódico-Schiff

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

SHED - Células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados

SIBLING - Pequenas glicoproteínas N-ligada ligantes *da* integrina

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

x – Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 Engenharia de tecidos	25
3.1.1 <i>Células-tronco e cultura celular</i>	25
3.1.2 <i>Fatores indutores</i>	29
3.1.3 <i>Arcabouço</i>	32
3.2 Dentina	35
3.2.1 <i>Dentição humana</i>	35
3.2.2 <i>Formação da dentina</i>	37
3.2.3 <i>Composição e classificação da dentina</i>	38
3.2.4 <i>Aplicação da dentina na engenharia de tecidos</i>	40
4 METODOLOGIA	44
4.1 <i>Delineamento experimental</i>	44
4.2 <i>Obtenção e análises das polpas dentárias</i>	45
4.3 <i>Caracterização das células-tronco</i>	47
4.3.1 <i>Adesão e morfologia celular</i>	47
4.3.2 <i>Análise de antígenos de superfície por citometria de fluxo</i>	47
4.3.3 <i>Diferenciação celular</i>	48
4.3.4 <i>Análise cariotípica</i>	49
4.4 <i>Congelamento das células-tronco</i>	49
4.5 <i>Descongelamento das células-tronco</i>	50
4.6 <i>Preparo do arcabouço de dentina</i>	50
4.7 <i>Caracterização do arcabouço de dentina</i>	52
4.7.1 <i>Avaliação da perda de massa</i>	52
4.7.2 <i>Análise da estrutura</i>	53
4.7.3 <i>Avaliação por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier</i>	53
4.7.4 <i>Avaliação da resistência à compressão</i>	53

4.7.5 Avaliação da citotoxicidade	54
4.8 Análise da interação entre as células-tronco e a dentina.....	55
4.9 Análise estatística	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Obtenção e análise das polpas dentárias	57
5.2 Caracterização das células-tronco	61
5.2.1 Adesão e morfologia celular	61
5.2.2 Análise de antígenos de superfície por citometria de fluxo	68
5.2.3 Diferenciação celular	70
5.2.4 Análise cariotípica	72
5.3 Preparo do arcabouço de dentina	73
5.4 Caracterização do arcabouço de dentina.....	77
5.4.1 Avaliação da perda de massa	77
5.4.2 Análise da estrutura	78
5.4.3 Avaliação por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier.....	82
5.4.4 Avaliação da resistência à compressão	85
5.4.5 Avaliação da citotoxicidade	86
5.5 Análise da interação entre as células-tronco e a dentina.....	89
6 DISCUSSÃO	102
7 CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar que utiliza os conceitos da engenharia e ciências da vida para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos ou órgãos do organismo. Para alcançar esses objetivos são desenvolvidos, em laboratório, substitutos biológicos, tais como os arcabouços (BARBANTI *et al.*, 2005; HOWARD *et al.*, 2008; O'BRIEN, 2011; DZOBO *et al.*, 2018).

Duas estratégias principais podem ser utilizadas empregando os arcabouços na recuperação de partes do corpo danificadas. Em primeiro lugar, os arcabouços podem ser usados para fornecer suporte estrutural para as células cultivadas *in vitro*, que irão produzir matriz extracelular, formando o tecido para o implante. A segunda maneira envolve o uso do arcabouço como uma fonte de fatores de crescimento. Neste caso, após a implantação do arcabouço, os fatores de crescimento recrutam, através de sinalizações, células do próprio corpo do paciente para formar o tecido sobre o arcabouço. As duas técnicas podem ser combinadas para potencializar a restauração tecidual (HOWARD *et al.*, 2008).

As escolhas dos tipos de arcabouços e células devem ser criteriosamente analisadas, tendo em vista o propósito da utilização. Diversas características do arcabouço, como estrutura, composição e propriedades mecânicas são capazes de interagir e influenciar o comportamento celular. A natureza do arcabouço tem a capacidade de modificar a resposta das células, influenciando, por exemplo, a proliferação, diferenciação e síntese de matriz (BOYAN *et al.*, 1996; HOWARD *et al.*, 2008; VAGASKÁ *et al.*, 2010).

A dentina é um tecido que compõe a maior parte do dente e vem despertando grande interesse na engenharia de tecidos, devido às suas características. Por apresentar uma estrutura tridimensional constituída por cristais de hidroxiapatita carbonatada, proteínas colágenas e fatores indutores, como os fatores de crescimento, a dentina vem sendo considerada para utilização como arcabouço (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a; UM, 2018; SARI *et al.*, 2019).

A dentina é um material de origem natural e pode ser obtida de dentes que geralmente são descartados em clínicas odontológicas. Após implantação no organismo, exibem baixa capacidade de suscitar uma resposta imunológica (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a).

A escolha da origem das células é de extrema importância para as técnicas de engenharia de tecidos, tendo sempre em vista a aplicação final e o tipo de arcabouço utilizado. As células devem ter a capacidade de preencher o arcabouço e produzir uma matriz semelhante a do tecido ao qual se pretende a restauração. Atualmente, existem diversas linhagens celulares disponíveis para combinação com diferentes arcabouços (HOWARD *et al.*, 2008; KAUR, G. & DUFOUR, 2012; COURTENAY *et al.*, 2018).

A utilização de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth* – SHED) é especialmente interessante na engenharia de tecidos. Essas células apresentam capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, após estímulo com um meio indutor. As SHED podem ser armazenadas em bancos de células (criopreservadas) e serem utilizadas posteriormente de forma autóloga (pelo próprio paciente) ou de forma alógena (geralmente por um parente próximo do doador das células) (SOARES *et al.*, 2007; KERKIS & CAPLAN, 2012. CONDE *et al.*, 2016).

De forma semelhante à dentina, as SHED são obtidas de um tecido que normalmente é desprezado após a esfoliação (extração ou perda) dos dentes decíduos. Assim, seu uso minimiza as preocupações éticas que outros tipos de células-tronco apresentam, como as células-tronco embrionárias (KERKIS & CAPLAN, 2012). Na terapia regenerativa, a utilização das SHED é promissora para o reparo de diversos tecidos, em especial para o tecido ósseo, em virtude de sua elevada capacidade de diferenciação osteogênica. Defeitos ósseos, como em mandíbulas, foram reparados com sucesso utilizando as SHED (WANG *et al.*, 2012; SUKARAWAN & OSATHANON, 2017). Para indução da diferenciação osteogênica e utilização nas técnicas de engenharia de tecidos, as SHED requerem um meio indutor e um arcabouço apropriado (SOARES *et al.*, 2007).

À vista disso, a dentina pode ser contemplada para utilização como arcabouço para as SHED, visando a engenharia de tecidos ósseos. A dentina, por conter hidroxiapatita, colágeno tipo I e vários fatores de crescimento, possui propriedades osteoindutora e osteocondutora (KATTIMANI *et al.*, 2016; TABATABAEI *et al.*, 2016a; UM., 2018; SARI *et al.*, 2019).

A dentina isolada vem sendo pesquisada para utilização como enxerto em defeitos ósseos, mostrando boa biocompatibilidade com o tecido e reabsorção na

área lesada. Também há estudos do uso da dentina como arcabouço para a própria restauração dentária (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a; UM *et al.*, 2017). No entanto, este estudo pretende avaliar a utilização da dentina humana como arcabouço para as SHED, visando o reparo de lesões em osso alveolar. Desta forma, será verificado se a dentina proporciona uma estrutura que permita a adesão e a proliferação celular, em um período que possibilite a diferenciação osteogênica das SHED.

Vale ressaltar que a dentina apresenta boas vantagens em relação ao tecido ósseo como arcabouço, pois apresenta maior disponibilidade (frequentemente é descartada nos procedimentos de exodontia), podendo também ser obtida em Biobancos de dentes e também de dentes decíduos, esfoliados naturalmente. Este tecido apresenta grande potencial de uso no reparo de pequenos defeitos ósseos, comumente encontrados em pacientes com edentulismo, condição que acomete mais de 70% dos idosos em 2020 (CARDOSO *et al.*, 2016; UM *et al.*, 2017). Desta maneira, pesquisar formas de se empregar este tecido como arcabouço é de grande relevância para a odontologia.

A forma de preparo da dentina exerce um papel fundamental na melhoria de suas características, promovendo a disponibilidade dos fatores indutores presentes neste tecido e, com isso, potencializando seu papel como arcabouço (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a; SUKARAWAN & OSATHANON, 2017). Portanto, encontrar um protocolo de preparação da dentina acessível e eficiente é um passo importante para sua utilização clínica. Os trabalhos encontrados na literatura utilizam a dentina desmineralizada como enxerto, mas é necessário o estudo de como os tratamentos desmineralizantes afetam suas características, por meio de avaliações da composição química, resistência mecânica, citotoxicidade e biocompatibilidade com as SHED.

Para o emprego das SHED, visando a aplicação clínica, se faz necessário também validar os métodos de obtenção, compreendendo sua eficiência para a aquisição destas células-tronco. E além de verificar o potencial de diferenciação das SHED é preciso ainda avaliar se durante o período de cultura, não há a presença de contaminação e se a estabilidade cromossomo das células é mantida, reduzindo assim, os riscos de complicações para o paciente após o implante no organismo.

Estes aspectos motivaram a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo objetiva obter e caracterizar as células-tronco, obtidas da polpa de dente decíduos humanos, assim como encontrar o melhor preparo da dentina, para proporcionar uma estrutura que permita a adesão e a proliferação celular, em um período que possibilite a diferenciação osteogênica das células, visando o reparo de lesões em osso alveolar.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, tem-se:

- Obter e caracterizar as SHED;
- Analisar se as culturas de células obtidas estão livres de contaminação;
- Avaliar a estabilidade cromossômica das SHED;
- Realizar o preparo e tratamento dos arcabouços de dentina;
- Analisar a perda de massa, estrutura, composição química, resistência mecânica e citotoxicidade dos arcabouços, após a realização dos tratamentos desmineralizantes;
- Avaliar a morfologia e proliferação das SHED aderidas aos arcabouços.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Engenharia de tecidos

O termo engenharia de tecidos foi oficialmente utilizado em um *Workshop* da *National Science Foundation* no ano de 1988. Este campo tem como objetivo utilizar os conhecimentos e as técnicas das áreas de engenharia de materiais, biológica e médica para o entendimento das condições normais e patológicas dos tecidos que formam os organismos dos mamíferos, buscando o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, melhorem e mantenham as funções destes tecidos (BARBANTI *et al.*, 2005; O'BRIEN, 2011; COURTENAY *et al.*, 2018). Na engenharia de tecidos, três componentes são considerados essenciais, sendo eles: as células-tronco, que irão formar o tecido; o arcabouço, que atuará como um molde para a formação tecidual, fornecendo suporte para adesão, crescimento, migração e diferenciação das células; e os fatores indutores, como os fatores de crescimento, que auxiliarão no processo de restauração (CHAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; O'BRIEN, 2011; COURTENAY *et al.*, 2018).

Uma das estratégias utilizadas na engenharia de tecidos, visando a restauração tecidual, é o cultivo celular utilizando arcabouços (também conhecidos como *scaffolds*, matrizes tridimensionais, etc.). Nesta técnica, inicialmente é efetuada a coleta de uma amostra do tecido do próprio paciente que, em seguida, é dissociado em células. Essas células isoladas são cultivadas por um determinado período e inoculadas sobre os arcabouços biológicos ou sintéticos que apresentam, pelo menos em parte, as características da matriz extracelular do tecido alvo da restauração. Posteriormente, o arcabouço com as células é implantado no local da lesão no organismo do paciente (BARBANTI *et al.*, 2005; ORÉFICE *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2008; FRESHNEY, 2010).

3.1.1 Células-tronco e cultura celular

O corpo humano é composto por quatro tipos principais de tecidos: epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. Cada tecido é, por sua vez, formado por células e

matriz extracelular que estão em constante interação (ALBERTS *et al.*, 2010; FARLEY *et al.*, 2012).

As células são responsáveis por produzir, complexar e exportar as diferentes moléculas que irão formar os complexos macromoleculares da matriz extracelular. E por sua vez, a matriz modula a estrutura, fisiologia e a biomecânica dos tecidos (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2007; ALBERTS *et al.*, 2010).

Cada tipo de tecido é composto por células características que sintetizam os diferentes componentes da matriz. De modo geral, os elementos que compõem a matriz podem ser divididos em três grupos: fibrilares, correspondendo aos colágenos fibrilares e as fibras elásticas; não fibrilares, representados pelos proteoglicanos e pelo grupo das glicoproteínas estruturais não-colagênicas; e as microfibras, que são formadas pelo colágeno tipo VI e pelas microfibrilas associadas à elastina (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2007).

Nos tecidos intactos, as células se desenvolvem em um ambiente tridimensional, apresentando ligações com a matriz extracelular e com as outras células. No entanto, para o estudo do desenvolvimento celular, em determinadas condições, muitas vezes é necessário dissociá-las dos tecidos e mantê-las sob condições controladas, em um ambiente que propicie a adesão e a proliferação. Este método é denominado cultura celular e permite obter informações relevantes sobre o comportamento das células, sem a necessidade da utilização de animais nos experimentos (ALBERTS *et al.*, 2010; MOLINARO *et al.*, 2009).

Para o cultivo celular, primeiramente, é necessário isolar as células dos tecidos, por migração espontânea, utilizando a técnica de cultivo de explante (fragmentos teciduais) ou por métodos de desagregação mecânica ou enzimática que geram uma suspensão de células já dissociadas. As recentes células isoladas irão aderir aos frascos de cultura, formando a primeira monocamada celular. Essas células são denominadas primárias e possuem o fenótipo e genótipo do tecido de origem (ORÉFICE *et al.*, 2006; MOLINARO *et al.*, 2009; FRESHNEY, 2010; BASSO & BRACARENSE, 2013).

Após serem realizadas subculturas (passagens), as células ainda possuem a maioria das características do tecido de origem; porém, apresentam maior taxa de proliferação, sendo agora denominadas linhagens celulares contínuas (ADAMS, 1990; MOLINARO *et al.*, 2009). As linhagens podem permanecer em cultura por um

longo tempo e serem armazenadas em nitrogênio líquido, por períodos indefinidos, mantendo a viabilidade após serem descongeladas (MOLINARO *et al.*, 2009; ALBERTS *et al.*, 2010).

Como, em grande parte, as propriedades das células em cultura são mantidas, elas são de extrema importância para a pesquisa, pois é possível acompanhar seu desenvolvimento de uma maneira mais acessível do que nos tecidos intactos. Dentre as células estudadas atualmente, uma das mais promissoras do ponto de vista médico são as células-tronco (MOLINARO *et al.*, 2009; ALBERTS *et al.*, 2010).

As células-tronco apresentam um amplo potencial de utilização na restauração de tecidos e na terapia de doenças. Aplicações dessas células foram estudadas e demonstraram resultados positivos em diversas áreas, como no tratamento de lesões da medula, cartilagem, músculos, ossos, retina, tecido dentário e na terapia de doenças hepáticas, pulmonares, diabetes, câncer, anemia e virais (MAHLA, 2016).

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas com um potencial de auto-renovação, por divisão celular e de diferenciação em diferentes tipos celulares. Sob certas condições fisiológicas ou experimentais, as células-tronco podem ser induzidas a se tornarem células com funções específicas (células diferenciadas). A diferenciação destas células pode ser reconhecida por alterações na morfologia e pela detecção de proteínas específicas de superfície celular (SOARES *et al.*, 2007; LA NOCE *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2014; LOS *et al.*, 2018).

Existem duas categorias de células-tronco, quanto à sua origem: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias são derivadas do zigoto ou do interior da massa celular interna do blastocisto, estágio do embrião com cerca de 5 dias após sua formação. As células provenientes do zigoto são classificadas como totipotentes, pois podem se diferenciar em qualquer linhagem derivada dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) e nos anexos embrionários (sendo para os mamíferos: alantoide, âmnio, córion, vesícula vitelina, placenta e cordão umbilical). As células-tronco do blastocisto são denominadas pluripotentes, apresentando a capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (ROBEY, 2000; SOUZA *et al.*, 2010; VERMA *et al.*, 2014).

A maior vantagem do uso de células-tronco embrionárias é a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Porém, a utilização destas células possui desvantagens, como a questão ética relacionada ao uso de embriões (ROBEY, 2000; SOARES *et al.*, 2007).

As células-tronco adultas residem em tecidos diferenciados do organismo e seu principal papel é manter e reparar o tecido no qual são encontradas. A vantagem na utilização das células-tronco adultas reside no fato de que essas células podem ser extraídas dos próprios pacientes (autólogas) e não envolvem as questões éticas relacionadas ao uso de embriões. Entretanto, essas células são multipotentes, apresentando uma menor capacidade de diferenciação e de proliferação em comparação com as células-tronco embrionárias (SOARES *et al.*, 2007; RATNER *et al.*, 2012; LA NOCE *et al.*, 2014).

As células-tronco adultas incluem, dentre outras, as células-tronco hematopoiéticas, neurais e mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas exibem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células sanguíneas e são encontradas principalmente na medula óssea. As células-tronco neurais dão origem aos neurônios e as células da glia. Essas células residem tipicamente na zona subventricular e no hipocampo. As células-tronco mesenquimais exibem a capacidade de diferenciação em linhagens celulares mesodérmicas como, por exemplo, condrogênica, osteogênica e adipogênica. As células-tronco mesenquimais apresentam adesão ao substrato e sua morfologia assemelha-se a fibroblastos. Ainda, possuem a capacidade de secretar diversos fatores tróficos que podem afetar outras células de maneira parácrina. Essas células estão presentes na medula óssea, músculo esquelético, retina, fígado, pele, coração, intestino e polpa dentária (RATNER *et al.*, 2012; VERMA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo localizado no interior dos dentes. É considerada uma interessante fonte de células-tronco mesenquimais devido à quantidade considerável de células encontradas. As células-tronco da polpa dentária apresentam elevada capacidade proliferativa e de diferenciação em diversos tipos celulares, após estímulo por um fator indutor (SOARES *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010; LA NOCE *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2014; POTDAR & JETHMALANI, 2015; BAKOPOULOU & ABOUT, 2016). Estudos indicam que essas células possuem habilidade de se diferenciar em: osteoblastos, odontoblastos, adipócitos, condrócitos

e células da linhagem neural (KAWASHIMA, 2012; WANG *et al.*, 2012; JIAO *et al.*, 2014; SUKARAWAN & OSATHANON, 2017).

As células-tronco podem ser obtidas da polpa de dentes humanos decíduos esfoliados (SHED) ou de dentes permanentes. A utilização das SHED representa uma grande alternativa para restauração tecidual, pois são obtidas a partir de tecido que é normalmente descartado e facilmente acessível em pacientes jovens (CORDEIRO *et al.*, 2008; LA NOCE *et al.*, 2014). As SHED também apresentam vantagens em relação às células-tronco obtidas da polpa de dentes humanos permanentes, exibindo uma maior taxa de proliferação e de diferenciação e um maior potencial para formação óssea e dentinária (WANG *et al.*, 2012).

As SHED são dependentes de ancoramento, ou seja, quando se encontram nos tecidos, estão aderidas à matriz extracelular (CHAN *et al.*, 2008). Na realização da cultura destas células, a adesão a um substrato é de extrema importância para sua sobrevivência e crescimento (HAYMAN *et al.*, 1985).

Nas culturas das SHED também é imprescindível a manutenção de um ambiente controlado. Fatores como concentração de gás carbônico, temperatura e quantidade de nutrientes devem ser rigorosamente mantidos. O meio de cultura é o responsável por fornecer os nutrientes essenciais para o desenvolvimento celular e manter os níveis de pH e osmolaridade dentro dos limites aceitáveis para as células (DAVIS, 2002; GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER *et al.*, 2010).

Entretanto, a suplementação dos meios, com soro de origem animal, é amplamente realizada, pois provêm substâncias, como os fatores de adesão e crescimento, que auxiliam a adesão, o espalhamento e o metabolismo das células, além de induzirem um aumento da proliferação celular (GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER *et al.*, 2010).

3.1.2 Fatores indutores

Vários fatores de indução ou moléculas bioativas, como os fatores de crescimento, são necessários para a morfogênese e restauração tecidual. Os fatores de crescimento são peptídeos com ampla diversidade de funções, agindo principalmente como estimuladores de proliferação, diferenciação e síntese de matriz extracelular (MARX, 2004; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

As ações desencadeadas nas células pelos fatores de crescimento são decorrentes das ligações destes com os receptores de superfície celular, que induzem a ativação de proteínas sinalizadoras, levando ao controle da expressão gênica (MARX, 2004). No entanto, a ação desses elementos não é sempre homogênea, pois a concentração e o tipo de célula alvo podem influenciar na resposta celular (GRAZIANI *et al.*, 2006; DRENGK *et al.*, 2009).

A superfamília dos fatores de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta* - TGF- β) constitui mediadores que estimulam a proliferação em células-tronco mesenquimais, fibroblásticas, osteoblásticas e musculares lisas e inibem a proliferação de macrófagos e linfócitos (MARX *et al.*, 1998; EPPLEY *et al.*, 2004). O TGF- β ainda regula a produção de matriz extracelular e o efeito mitogênico de outros fatores de crescimento (HWANG *et al.*, 1992; EPPLEY *et al.*, 2004).

As proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins* - BMPs) são fatores de crescimento essenciais no processo de reparação dentária e óssea. As BMPs fazem parte da superfamília dos TGF- β (SOARES *et al.*, 2007). Em especial, as BMP-2 apresentam importante papel na formação e reparação óssea e na diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, aumentando a atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina (SANTOS *et al.*, 2005; CIRANO *et al.*, 2007; FONTANA, 2009).

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*insulin-like growth factor 1* - IGF-1) tem grande importância na regulação da manutenção dos ossos, participando do processo de restauração óssea. Também atua na sinalização para migração, proliferação e síntese de matriz em células-tronco mesenquimais e epiteliais. É ainda um importante modulador da apoptose celular (EPPLEY *et al.*, 2004; MAIA & SOUZA, 2009).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* – PDGF) age em diversos tipos celulares, promovendo a proliferação e síntese de matriz. Em combinação com o IGF contribui para a restauração óssea (EPPLEY *et al.*, 2004; DUSSE *et al.*, 2008).

O fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* – EGF) apresenta a capacidade de induzir a proliferação em certos tipos celulares, como as células-tronco mesenquimais, endoteliais, fibroblásticas e queratinócitas. Estimula a

quimiotaxia endotelial e angiogênese; e também regula a produção de matriz extracelular (EPPLEY *et al.*, 2004; MAIA & SOUZA, 2009).

A família dos fatores de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factors* – FGF) é formada por polipeptídios envolvidos na síntese de matriz, proliferação, diferenciação e sobrevivência de diversos tipos celulares, como os osteoblastos e condrócitos. O FGF também influencia a angiogênese (GAISSMAIER *et al.*, 2008; WANG, 1996).

O fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) é conhecido por estimular a proliferação das células endoteliais, aumentando a angiogênese e permeabilidade vascular (MAIA & SOUZA, 2009).

Além dos fatores de crescimento, existem outras moléculas que influenciam na restauração tecidual. A família das pequenas glicoproteínas N-ligadas da integrina (*small integrin binding N-linked glycoproteins* - SIBLING) são fatores altamente expressos em tecidos mineralizados como o tecido ósseo e dentário. Essas proteínas são responsáveis por iniciar e modular os processos de diferenciação e mineralização celular via interação matriz-célula. Desempenham também múltiplas e distintas funções no desenvolvimento, remodelação e reparo ósseo (MALAVAL *et al.*, 2008; BOUET *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017).

Entre os membros da SIBLING estão a sialofosfoproteína dentinária (*dentin sialophosphoprotein* - DSPP), proteína da matriz dentinária 1 (*dentin matrix protein 1* - DMP1), sialoproteína óssea (*bone sialoprotein* - BSP), osteopontina (*osteopontin* - OPN) e fosfoglicoproteína extracelular da matriz (*matrix extracellular phosphoglycoprotein* - MEPE) (MALAVAL *et al.*, 2008; BOUET *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017).

Os fatores de indução, *in vivo*, desenvolvem suas atividades em sinergia uns com os outros, podendo tanto agir para amplificar um estímulo como de modo antagonista. Sendo assim, é necessário, não apenas um fator para a correta formação ou reparação tecidual, mas sim de uma combinação destes (FORTIER *et al.*, 2011).

3.1.3 Arcabouço

O arcabouço possui um papel fundamental na aplicação das técnicas de engenharia de tecidos, sendo o responsável por fornecer o suporte estrutural para as células enquanto essas produzem sua própria matriz extracelular, necessária para a formação dos novos tecidos. O arcabouço também é responsável por controlar e dirigir o comportamento e as interações celulares através de sinais químicos e de sua morfologia (ZHANG *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2011; O'BRIEN, 2011).

Para a escolha do arcabouço a ser utilizado na engenharia de tecidos, algumas características gerais devem ser consideradas. Primeiramente, o arcabouço deve apresentar uma estrutura tridimensional biocompatível, que permita a adesão e crescimento celular e, quando implantado no organismo, não deve suscitar uma resposta inflamatória que possa levar à sua rejeição (O'BRIEN, 2011).

A adesão é a primeira fase da interação células-arcabouço e é vital para as células que dependem de ancoramento. Após a adesão ao arcabouço, as células podem se espalhar, migrar, proliferar, diferenciar e sintetizar matriz extracelular (O'BRIEN, 2011). As características da superfície dos arcabouços como topografia, química e energia superficial desempenham um papel essencial na adesão (ANSELME, 2000).

No início da adesão celular, ocorre a fase de fixação, por meio das ligações físico-químicas entre as células e o arcabouço, envolvendo as forças iônicas e de van der Waals. Em seguida, inicia-se a interação entre as proteínas presentes no arcabouço, na membrana celular e no citoesqueleto. Nesta etapa, é necessária a presença de determinadas proteínas na superfície do arcabouço, como a fibronectina, a vitronectina e o fibrinogênio. Essas proteínas irão se ligar às proteínas da membrana celular, tais como as integrinas, que também são responsáveis pela ligação com as proteínas do citoesqueleto. Essa interação induzirá a transdução de sinais que desencadeará a regulação da expressão gênica, promovendo diversos eventos nas células, como o espalhamento e a proliferação (ANSELME, 2000).

O arcabouço deve mimetizar, pelo menos em parte, a matriz extracelular do tecido ao qual se pretende a restauração. A reprodução das propriedades mecânicas, como resistência à compressão e tração, do sítio anatômico no qual o

arcabouço será inserido, é importante para o sucesso da restauração. Quando as forças do local do implante são exercidas sobre os arcabouços, as células podem perceber a rigidez do material (mecanossensibilidade), o que pode afetar seu comportamento, gerando modificações em sua adesão e morfologia. A mecanossensibilidade também pode influenciar a diferenciação das células-tronco (BARBANTI *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

Os substitutos biológicos implantados no organismo, para recuperar funções de tecidos e órgãos danificados, podem ser classificados em dois grupos, em relação ao tempo de permanência no organismo. Os implantes permanentes, como válvulas cardíacas, lentes intraoculares e próteses articulares, visam a substituição dos tecidos danificados por tempo indeterminado. Esses dispositivos conservam suas características por longos períodos (BARBANTI *et al.*, 2005; SANTOS JR & WADA, 2007).

Os implantes temporários, como os arcabouços, têm por objetivo permitir que as células produzam suas próprias matrizes e os substituam ao longo do tempo, auxiliando, desta forma, na recomposição tecidual. Para isto, os arcabouços devem exibir uma taxa de degradação compatível com a restauração do tecido (BARBANTI *et al.*, 2005; SANTOS JR & WADA, 2007; CHAN *et al.*, 2008; O'BRIEN, 2011).

A estrutura do arcabouço é uma característica imprescindível de ser avaliada. Em geral, é desejável que o arcabouço apresente poros interconectados que possibilitem a penetração das células por todo o construto. Além disso, a estrutura interconectada deve permitir o transporte eficiente de nutrientes e oxigênio para todas as células presentes no arcabouço, bem como a eliminação de metabólitos. No entanto, apesar de ser favorável a presença de poros, o arcabouço ainda deve apresentar uma superfície com área suficiente para permitir a adesão das células, com a formação dos pontos de adesões focais (CHAN *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2011; O'BRIEN, 2011). Além disso, o arcabouço deve exibir um custo e técnicas de produção clinicamente e comercialmente viáveis (O'BRIEN, 2011). O arcabouço também pode servir como um veículo de entrega ou reservatório de diversos fatores indutores, como os fatores de crescimento, que participam da restauração tecidual (CHAN *et al.*, 2008).

Segundo a origem dos materiais que formam os arcabouços, eles podem ser divididos em três classes: naturais, sintéticos ou semissintéticos. Os materiais

naturais são obtidos de fontes naturais e apresentam propriedades que se assemelham às dos tecidos do organismo. Também, podem possuir sinais em sua superfície que propiciem a adesão celular. No entanto, devido à sua origem, os materiais naturais podem exibir uma maior variação em seus componentes e quantidades, e são menos favoráveis a modificações de suas características durante os processos de produção. Exemplos de materiais naturais amplamente utilizados na engenharia de tecidos são o colágeno, a gelatina e a quitosana (CUNHA *et al.*, 2011).

Os materiais naturais ainda podem ser classificados de acordo com a origem da fonte natural. Os materiais autólogos são oriundos do próprio paciente. Os alógenos são provenientes da mesma espécie do receptor, e os materiais xenógenos são de origem de uma espécie diferente daquela do paciente que receberá o implante (O'BRIEN, 2011).

Os materiais sintéticos são produzidos de modo artificial pela síntese de componentes selecionados. Com isso, estes materiais podem ser projetados para possuir características específicas e serem confeccionados em grande escala, com pouca variação entre os lotes. Os materiais sintéticos podem apresentar um menor custo de fabricação e são mais facilmente modificados em comparação com os naturais. Porém, apesar de suas vantagens, esses materiais podem possuir poucos sinais de reconhecimento para as células, resultando em baixa adesão celular em sua superfície. Os polímeros α -hidróxi ácidos e os hidrogéis são exemplos de materiais sintéticos utilizados como arcabouços (CUNHA *et al.*, 2011).

Os materiais semissintéticos são uma combinação dos materiais sintéticos com os de origem natural, podendo possuir as características favoráveis de ambos os tipos. De forma similar aos materiais sintéticos, esses híbridos possuem uma ampla e selecionada variedade de características mecânicas, produção em larga escala, com alta reprodutibilidade e boa capacidade de processamento. Além disso, podem apresentar os sinais favoráveis para as interações com as células, como os materiais naturais. Um exemplo de desenvolvimento de material semissintético é o acoplamento de laminina em nanofibras de poli (L-ácido láctico) (PLLA) (CUNHA *et al.*, 2011).

Sendo assim, ao idealizar um arcabouço para a engenharia de tecidos, é importante considerar suas características, pois estas irão influenciar diretamente o desenvolvimento das células.

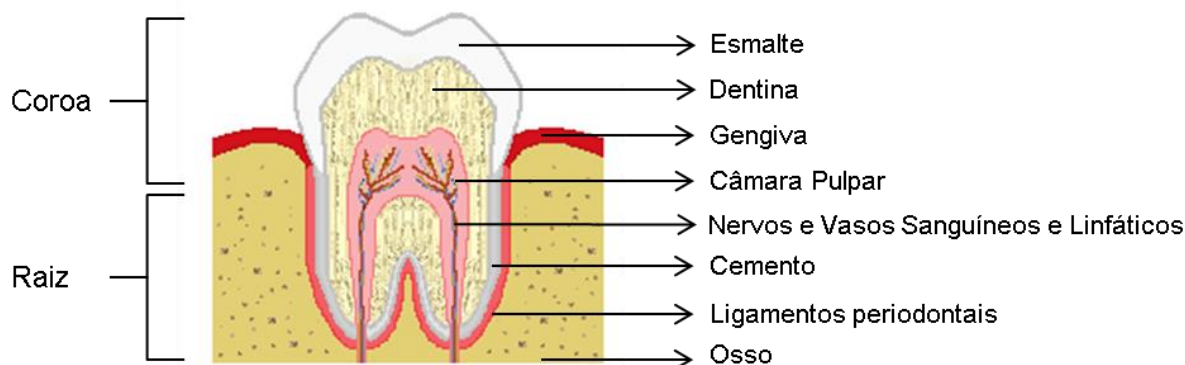
3.2 Dentina

3.2.1 Dentição humana

A dentição humana é composta por dois conjuntos de dentes: os decíduos e os permanentes. Os dentes decíduos (popularmente chamados de dentes de leite) começam a aparecer por volta do 6º mês após o nascimento, chegando a um total de 20 dentes. Esta primeira dentição geralmente é perdida e substituída na faixa etária de 6 a 12 anos. Os dentes permanentes, que normalmente erupcionam aos 6 anos de idade, podem permanecer durante toda a vida dos indivíduos. A dentição permanente completa é composta por 32 dentes, sendo eles: oito incisivos, quatro caninos, oito pré-molares e doze molares (OKESON, 2013; TORTORA & DERRICKSON, 2017).

Os dentes estão localizados nos alvéolos (cavidades) dentais dos ossos da mandíbula (arcada inferior) e maxila (arcada superior). Cada dente pode ser dividido, anatomicamente, em duas regiões principais: a coroa, parte visível acima do tecido gengival; e a raiz, porção que fica inserida no osso alveolar e ligada a este por meio dos ligamentos periodontais (Figura 1). Na porção interna, os dentes são formados predominantemente por um tecido conjuntivo mineralizado denominado dentina. A dentina da coroa é recoberta pelo esmalte, tecido altamente mineralizado, e, na região da raiz, pelo cimento (OKESON, 2013; TORTORA & DERRICKSON, 2017).

Figura 1 - Figura esquemática de um corte sagital de um dente molar humano.



Fonte: Própria.

Na parte central dos dentes está localizada a câmara pulpar e os canais radiculares, espaços que contêm a polpa dentária (Figura 1). A polpa é um tecido conjuntivo não mineralizado, que apresenta nervos e vasos sanguíneos e linfáticos. A câmara pulpar na região da coroa tem continuidade na raiz (canais radiculares), terminando em uma abertura no ápice do dente, o forame apical da raiz, que permite a passagem dos vasos e nervos (OKESON, 2013; TORTORA & DERRICKSON, 2017).

A polpa apresenta diferentes tipos celulares, sendo os fibroblastos o maior grupo em quantidade de células. Na região periférica da polpa são encontrados os odontoblastos, responsáveis pela síntese da dentina. Na polpa, como mencionado anteriormente (tópico 2.1.1), ainda são encontradas células-tronco mesenquimais (as SHED). Essas células podem se diferenciar nos fibroblastos e odontoblastos, para repor tais populações após uma lesão. Na matriz extracelular da polpa o principal componente fibroso é o colágeno tipo I, mas também está presente o colágeno tipo III. A matriz ainda apresenta fibronectina e um alto conteúdo de proteoglicanos (LINDE, 1985; BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Com o aumento da idade dos indivíduos, os dentes sofrem alterações em sua estrutura. A câmara pulpar diminui de tamanho por causa da deposição de dentina. Na polpa ocorre um decréscimo no número de células, em particular das SHED, e um aumento da quantidade de fibras colágenas (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

3.2.2 Formação da dentina

A formação dos dentes (odontogênese) é um processo complexo e altamente coordenado, que envolve eventos celulares e moleculares, iniciando-se no final da quinta semana de vida intrauterina. O desenvolvimento correto dos dentes depende de interações entre o epitélio oral (derivado do ectoderma) e o ectomesênquima (derivado de células da crista neural), podendo ser dividido em cinco fases: botão, capuz, campânula, coroa e raiz (KOUSKOURA *et al.*, 2011; MAFRA *et al.*, 2012).

Durante a fase do botão, as células do epitélio proliferam e invaginam em direção ao ectomesênquima, criando projeções em forma de botões. Simultaneamente, as células ectomesenquimais se condensam ao redor do botão (KOUSKOURA *et al.*, 2011; MAFRA *et al.*, 2012).

Na fase capuz, a proliferação celular tem continuação, resultando na formação de uma estrutura em forma de capuz. Nesta etapa é possível a observação dos germes dentários, constituídos por uma porção do epitélio que sofreu invaginação (denominada órgão do esmalte) e uma porção do ectomesênquima (chamada papila dentária). O órgão do esmalte dará origem ao esmalte, e as células da papila dentária formarão a dentina e polpa. Envolvendo o germe dentário, é formada uma nova camada de células ectomesenquimais, o folículo dentário, que posteriormente irá originar os componentes do periodonto, como a gengiva, os ligamentos periodontais, o cimento e o osso alveolar. Finalizando esta fase, ocorre a separação entre o epitélio oral e o germe dentário, que passa ser completamente envolvido pelo folículo dentário (MAFRA *et al.*, 2012).

Ao longo da fase campânula ocorre a determinação do formato dos dentes. Nesta etapa, as células do órgão do esmalte diferenciam-se em pré-ameloblastos, induzindo a diferenciação das células da papila dentária em odontoblastos. Os odontoblastos, por sua vez, iniciam a deposição da pré-dentina, composta por fibras colágenas não mineralizadas, que provocam a diferenciação dos pré-ameloblastos em ameloblastos, células responsáveis pela formação do esmalte. Na etapa da coroa, os processos de dentinogênese (secreção de matriz da dentina) e amelogênese (secreção de matriz do esmalte) transcorrem na porção da coroa do dente em formação (MAFRA *et al.*, 2012).

Na dentinogênese, os odontoblastos secretam a matriz orgânica que, em seguida, é mineralizada, formando um tecido tubular, com os denominados túbulos dentinários (MAFRA *et al.*, 2012). A mineralização ocorre em duas etapas: primária e secundária. Na fase inicial, os cristais de hidroxiapatita (fosfato de cálcio) formam-se como glóbulos (calcosferitos) nas fibras colágenas em determinadas áreas da dentina. Ainda nesta fase os glóbulos sofrem expansão e fusão (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Na mineralização secundária, novas áreas de formação de glóbulos ocorrem na dentina. Essas novas áreas de formação de cristais estão arranjadas em camadas. Os glóbulos continuam a se expandir e sofrem fusão de forma incompleta. Em algumas regiões da dentina ocorre a fusão completa dos cristais, sendo denominada dentina globular. Nas áreas de mineralização primária e sem fusão completa dos glóbulos, a dentina é classificada como dentina interglobular (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Os odontoblastos não ficam aprisionados na matriz que secretam; após a mineralização, eles ficam localizados na periferia da polpa e apenas as longas expansões dos seus citoplasmas permanecem no interior dos túbulos da dentina adjacente à polpa. A secreção da dentina, pelos odontoblastos, perdura durante a vida toda do dente (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Com o término da deposição do esmalte e da dentina na coroa, inicia-se a fase de formação da raiz, com a proliferação e diferenciação das células, síntese da dentina radicular e cemento. Desta forma é determinando o formato do dente e ocorre o crescimento da raiz. A formação da raiz é essencial para o processo de erupção dentária (MAFRA *et al.*, 2012).

3.2.3 Composição e classificação da dentina

A dentina é um tecido conjuntivo avascular, apresentando os túbulos dentinários que se estendem das junções esmalte-dentina na coroa e cemento-dentina na raiz até o encontro com a polpa. O diâmetro dos túbulos é maior nas proximidades da polpa e diminui em direção ao esmalte/cemento. O interior dos túbulos é preenchido pelo fluido dentinário (líquido tissular) (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Nos túbulos dentinários, mais próximos da polpa, estão presentes as expansões do citoplasma dos odontoblastos, que se encontram na polpa. Em alguns túbulos, ainda podem ser encontrados um axônio aferente. O corpo deste neurônio, igualmente aos odontoblastos, está localizado na polpa (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

A dentina é constituída por matéria orgânica, matéria inorgânica ou mineralizada, e água. A matéria orgânica abrange 20% do peso e 30% do volume, a matéria inorgânica compreende 70% do peso e 45% do volume e o restante é composto por água. No entanto, a distribuição dos componentes da matriz não é a mesma por toda a região da dentina (TJADERHANE *et al.*, 2011; BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012; TABATABAEI *et al.*, 2016a).

A matriz orgânica da dentina é composta predominantemente por colágeno, sendo o tipo I o mais abundante. Proteínas não colágenas também estão presentes como, por exemplo, TGF, BMPs, IGF, PDGF, EGF, FGF, VEGF, DSP, DMP-1, BSP, OPN, sialoproteína dentinária (*dentin sialoprotein* - DSP), osteocalcina e proteína Gla. Na porção orgânica ainda são encontrados proteoglicanos, glicoproteínas e lipídios (ROBERTS-CLARK & SMITH, 2000; TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a).

A matéria inorgânica é formada, em sua maior parte, por fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A hidroxiapatita pura não é encontrada nos sistemas biológicos, na dentina os cristais de hidroxiapatita contêm carbonato e outros íons, como citrato, sódio, magnésio, flúor e cloreto, sendo, portanto, uma apatita deficiente em cálcio, denominada apatita carbonatada (ARANA & BRADASCHIA, 2012; BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

A dentina apresenta diferentes classificações de acordo com: a região frente aos túbulos dentinários, sua origem e sua localização. A dentina que constitui a parede dos túbulos é denominada dentina peritubular e a localizada entre eles é a dentina intertubular. A dentina peritubular exibe níveis de mineralização maior do que a dentina intertubular (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

Em relação ao momento no qual é formada, a dentina pode ser classificada como: primária, secundária e terciária. A dentina primária é aquela sintetizada antes que se complete a formação do forame apical da raiz, enquanto a dentina secundária é depositada após a formação do forame e continua durante toda a vida

do dente. A dentina primária é formada mais rapidamente e é mais mineralizada que a secundária. A dentina terciária ou reacional é o tecido dentinário formado rapidamente após uma lesão, como as causadas por cáries ou procedimentos odontológicos (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

A dentina ainda pode ser classificada de acordo sua posição entre a polpa e a camada de esmalte e cemento. Na região que circunda a polpa, a dentina é designada dentina circumpulpar, apresentando uma mineralização menor do que a dentina mais externa, nomeada dentina do manto. A dentina circumpulpar é produzida e mineralizada após a dentina do manto e ocupa uma porcentagem maior do tecido (BATH-BALOGH & FEHRENBACH, 2012).

3.2.4 Aplicação da dentina na engenharia de tecidos

Materiais de origem natural despertam grande interesse na engenharia de tecidos, pois frequentemente exibem boa biocompatibilidade, baixa capacidade de gerar uma resposta imunológica e composição e propriedades mecânicas semelhantes à dos tecidos do organismo (TABATABAEI *et al.*, 2016a).

A dentina é um material com grande potencial para ser utilizada na restauração de tecidos. Obtida a partir de dentes extraídos ou esfoliados e que normalmente são descartados, a dentina pode ser utilizada como um arcabouço e/ou fonte de fatores indutores (TABATABAEI *et al.*, 2016a).

Para sua utilização na engenharia de tecidos, a dentina costuma passar por alguns tratamentos para melhoria de suas propriedades. No trabalho de revisão de Tabatabaei *et al.* (2016a), os autores dividem as metodologias de preparo da dentina, encontradas na literatura, em três categorias. No método de extração das proteínas não colagenosas, são utilizados ácidos, hidróxido de cálcio e diferentes tipos de agregados de trióxido mineral. Na eliminação da matriz orgânica, a dentina é submetida à fervura. Entretanto, na maioria dos estudos, a preservação das proteínas da matriz é de grande interesse para haver interação com as células e manutenção das propriedades mecânicas. No método de desmineralização, ocorre a remoção dos minerais da dentina. Esta é a técnica mais utilizada para o preparo da dentina, sendo utilizados como principais agentes desmineralizantes o ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA), o ácido

fosfórico, o ácido clorídrico e o ácido cítrico. As dentinas sem modificações também são utilizadas, geralmente, como grupo controle (TABATABAEI *et al.* 2016a).

A desmineralização da dentina permite a maior exposição dos túbulos dentinários, o afrouxamento das fibras de colágeno e a modificação da permeabilidade, o que favorece a liberação dos fatores indutores (GUO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012). A dentina desmineralizada é um material biorreabsorvível que apresenta uma redução da antigenicidade, comparada com a dentina sem tratamento. A matriz de colágeno, presente neste biomaterial, fornece uma estrutura com grande potencial para adesão, proliferação e migração celular (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a).

A dentina desmineralizada vem sendo estudada para sua utilização na engenharia de tecidos. É particularmente importante que o arcabouço apresente propriedades semelhantes às do tecido a ser reparado (TABATABAEI *et al.*, 2016a; UM, *et al.*, 2017; UM, 2018; SARI *et al.*, 2019). Nos últimos anos, pesquisas estão avaliando a utilização da dentina, como arcabouço, para a própria restauração dentária, contribuindo na estimulação da dentinogênese (GUO *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2015; BAKOPOULOU *et al.*, 2016; SUKARAWAN & OSATHANON, 2017).

Devido às similaridades de composição química com os ossos, ambos apresentando, 18% de colágeno, 2% de proteínas, 70% de porção inorgânica (hidroxiapatita) e 10% de fluidos, estudos estão considerando a dentina uma alternativa como enxerto para defeitos ósseos (GOMES *et al.*, 2006; MOHARAMZADEH *et al.*, 2008; YAGILHASHI *et al.*, 2009; KIM & CHOI, 2011; TABATABAEI *et al.*, 2016a; MINETT *et al.*, 2019). Para ser utilizado como enxerto ósseo, o material deve ser osteoindutor, ou seja, precisa induzir a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos, para formação de um tecido ósseo e/ou ser osteocondutor, possibilitando o crescimento de células osteogênicas em sua superfície. A dentina desmineralizada, por ser composta de hidroxiapatita, colágeno tipo I e vários fatores de crescimento, possui propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (SOARES *et al.*, 2007; UM *et al.*, 2018; SARI *et al.*, 2019).

Gomes *et al.* (2006) verificaram o processo de reparação óssea em alvéolos dentários, após exodontia dos terceiros molares em humanos, com a implantação de matriz dentinária desmineralizada autóloga. Os autores concluíram que a dentina foi biocompatível com o tecido ósseo, sendo reabsorvida durante o processo de

remodelação óssea. Foi também observado que o processo de reparação óssea foi discretamente mais rápido do que nos grupos sem implantação da dentina.

No estudo de Moharamzadeh *et al.* (2008), os autores analisaram a dentina alogênica como um material bioativo para o reparo de defeitos no fêmur de ratos. Como resultados, os autores constataram que dentina estimulou a formação óssea e foi completamente reabsorvida no processo de remodelação *in vivo*.

O trabalho de Yagilhashi *et al.* (2009) avaliou a utilização da matriz de dentina desmineralizada para indução da restauração osteocondral. No estudo, a dentina foi implantada em defeitos criados na articulação dos joelhos de coelhos. Foi verificado que a dentina contribuiu na diminuição do tempo de formação óssea, quando comparada com defeitos sem tratamento. Na pesquisa, ainda foi observado que o reparo da cartilagem na região da lesão foi superior com a presença da dentina implantada.

Kim e Choi (2011) realizaram o transplante de um terceiro molar para a área do primeiro molar, utilizando uma combinação de matriz dentina e óssea em pó no preenchimento do espaço entre o alvéolo e a raiz do dente implantado. Os autores concluíram que o material autólogo foi considerado apropriado na indução e reparação óssea no procedimento de autotransplante de dentes.

No estudo piloto de Xiao *et al.* (2019), os autores compararam a utilização da dentina e do osso (tratamento tradicional), para utilização como enxertos em defeitos ósseos alveolares, visando a restauração do volume e da qualidade óssea, em regiões em que os dentes foram perdidos, para a realização posterior de um implante. As dentinas autólogas foram obtidas de molares comprometidos dos pacientes. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em relação ao ganho ósseo. Portanto, a dentina restaurou o volume ósseo com sucesso e não apresenta as desvantagens da utilização dos enxertos ósseos autólogos, como a morbidade no local doador do enxerto.

Portanto, nos testes realizados, a dentina demonstrou que pode ser utilizada como material de enxerto ósseo, substituindo o osso ou acrescentada a este como material de enxerto. Em especial, vale ressaltar que a composição da dentina é muito semelhante à do osso alveolar, ambos são derivados de células da crista

neural e são compostos do mesmo colágeno tipo I (SHIDFAR *et al.*, 2018; MINETT *et al.*, 2019).

Contudo, apesar dos estudos presentes na literatura, ainda é necessária a análise de algumas questões para o uso da dentina como arcabouço. É preciso caracterizar como os tratamentos de desmineralização afetam as propriedades da dentina e sua biocompatibilidade. Além disso, embora as pesquisas têm utilizado a dentina para restauração de defeitos ósseos, é preciso avaliar criteriosamente o desenvolvimento, *in vitro*, das células sobre este material.

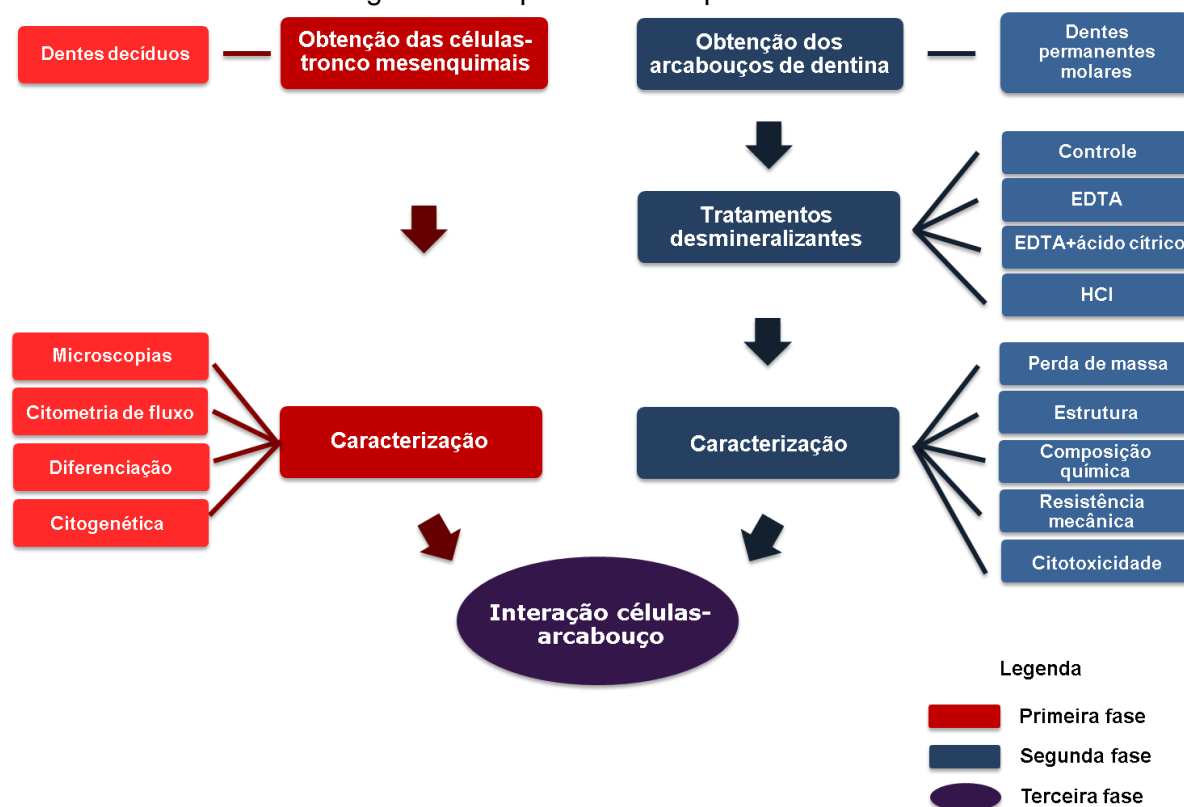
Portanto, encontrar uma preparação da dentina eficiente, um protocolo acessível e realizar sua caracterização são fundamentais para sua utilização segura como um arcabouço na engenharia de tecidos.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo *in vitro* randomizado dividido em três fases experimentais (Figura 2) distintas buscando-se, na primeira, determinar o protocolo de obtenção e caracterização das SHED; na segunda, o protocolo de preparação de arcabouço de dentina e, na terceira, verificar a interação das SHED com os arcabouços. Na primeira fase experimental, as SHED foram obtidas de polpas de dentes humanos recém-extraídos pelo cultivo de explante, com e sem a utilização da enzima tripsina. Em seguida, as células foram caracterizadas por meio de análises morfológicas, de diferenciação e por citometria de fluxo. As SHED também foram avaliadas quanto à presença de contaminação e estabilidade cromossômica. Na segunda fase experimental, arcabouços de dentina foram obtidos de dentes molares humanos permanentes hígidos. As amostras de dentina foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos para a realização dos tratamentos desmineralizantes: controle (sem tratamento), tratamento 1 (EDTA), tratamento 2 (EDTA e ácido cítrico) e tratamento 3 (HCl). Em seguida, os arcabouços foram esterilizados por radiação gama. Para caracterização das dentinas, foram realizadas avaliações da perda de massa, estrutura, composição química, resistência mecânica e citotoxicidade. Na terceira fase experimental, as SHED foram inoculadas sobre as amostras dos diferentes grupos experimentais de dentina, para verificação da interação células-arcabouço, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises estatísticas foram realizadas individualmente para cada variável resposta, considerando os blocos de dentina como unidades experimentais e os tratamentos da dentina como fator de variação, ao nível de significância de 5%. Foi empregado o teste estatístico mais apropriado, de acordo com a homogeneidade e normalidade de variâncias que os dados apresentaram.

Figura 2 - Esquema das etapas da tese.



Fonte: Própria

4.2 Obtenção e análises das polpas dentárias

O projeto foi submetido ao sistema Plataforma Brasil, para a liberação de sua realização pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do ABC, com certificado de apresentação para apreciação ética sob número (CAAE) 80572417.0.0000.5594.

Para obtenção das SHED, foram utilizados dentes decíduos humanos hígidos recém-extraídos na clínica de Odontologia infantil da Universidade Metodista de São Paulo. Os dentes foram extraídos de paciente com idade entre 8 a 13 anos, por razões que não as desta pesquisa e doados pelos pacientes e responsáveis.

Os dentes recém-obtidos foram armazenados individualmente em tubos cônicos para centrifugação contendo solução balanceada de Hanks (Vitrocell) e transportados até a Universidade Federal do ABC. Posteriormente, os dentes foram lavados com solução de Hanks e, em seguida, foi realizada a remoção dos tecidos periodontais, sob condições estéreis. O processamento dos dentes, para obtenção

das polpas, ocorreu dentro de 12 horas após a realização das coletas (TRAN *et al.*, 2015).

Nos dentes com raízes reabsorvidas, o tecido pulpar foi retirado da câmara pulpar com o auxílio de pinças e cureta (Golgran). Nos dentes com raízes, primeiramente foram realizados cortes em torno da junção cimento-esmalte (raiz-coroa) para exposição da câmara pulpar, utilizando um micromotor em baixa rotação (Beltec, LB-100) com discos de corte esterilizados por radiação gama, com uma dose de 25 kGy, no irradiador multipropósito de cobalto-60 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Comissão Nacional de Energia Nuclear, sediado em São Paulo (IPEN-CNEN/SP). Após o corte, a retirada da polpa foi efetuada com cureta e pinças.

As polpas obtidas foram processadas de duas maneiras diferentes para análise da obtenção das SHED: sem tratamento ou tratadas com tripsina. As amostras de polpa sem tratamento, após serem retiradas da câmara pulpar, foram colocadas diretamente em placa de cultura de seis poços, contendo alfa meio essencial mínimo (α -MEM, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 100 μ g/mL de penicilina/estreptomicina (LGC). As demais amostras de polpa foram, primeiramente, imersas em solução contendo 0,25% tripsina/0,02% EDTA (Cultilab) por 10 a 20 minutos e, em seguida, foram transferidas para poços da placa de cultura, contendo meio.

As polpas foram mantidas em estufa (Sanyo Scientific, COM-17AC) a 37 °C com 5% de CO₂, em atmosfera de ar umidificado. Foram realizadas observações das polpas por microscopia de luz com contraste de fase, ao microscópio invertido (Zeiss, Axiovert A1), para verificação da liberação das células na placa (SPATH *et al.*, 2010).

O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias, até as células atingirem 80% de confluência. Neste período, as células foram tripsinizadas por meio de uma solução contendo 0,25% tripsina/0,02% EDTA e transferidas para frascos de culturas. As polpas foram transferidas para novos poços da placa, para continuação da liberação de células, sendo mantidas por 35 dias.

Posteriormente, os tecidos pulpares foram preparados e analisados por MEV. Para a observação ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250), as polpas foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich), desidratadas em

série alcoólica (Dinâmica), submetidas à secagem em ponto crítico (Leica, EM CPD300) e metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm por *sputtering* (Leica, ACE200).

4.3 Caracterização das células-tronco

4.3.1 Adesão e morfologia celular

As SHED foram avaliadas para confirmação da natureza de células-tronco. Primeiramente, as células cultivadas foram observadas por microscopia de luz com contraste de fase, ao microscópio invertido, para verificação de sua adesão e morfologia (DOMINICI *et al.*, 2006).

As células também foram examinadas por microscopia de fluorescência e MEV. Nas análises, as células foram inoculadas em lamínulas de vidro e mantidas em cultura por 2 horas e 3 dias. Para observação ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, e coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Para análise ao microscópio eletrônico de varredura, as células foram preparadas de maneira semelhante ao preparo das polpas (tópico 4.2).

4.3.2 Análise de antígenos de superfície por citometria de fluxo

Alíquotas das SHED foram avaliadas por citometria de fluxo (BD, FACSCalibur), em colaboração com a empresa Criogênese, para análise da expressão de antígenos específicos de superfície.

Primeiramente, as células aderidas foram tripsinizadas com uma solução de 0,25% tripsina/0,02% EDTA. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1600 rpm durante 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi retirado e $1,0 \times 10^5$ células foram ressuspensas com 100 μ L de tampão fosfato-salino (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences).

Seguidamente, os marcadores de células hematopoiéticas CD34-PE e CD45-FITC e os marcadores de células-tronco mesenquimais CD73-PerCP, CD90-PerCP e CD105-PerCP (BD Biosciences) foram adicionados as células, por 30 minutos. Os

perfis de expressão foram examinados usando o programa BD CellQuest Pro e 50.000 eventos foram coletados para análise (DE VITA *et al.*, 2013).

4.3.3 Diferenciação celular

Para confirmação da plasticidade das células obtidas da polpa foi realizado o teste de diferenciação celular em múltiplas linhagens. Neste ensaio, foram utilizados meios de cultura para indução da diferenciação em linhagens osteogênica (StemPro osteogenesis differentiation kit, Thermo Fisher), adipogênica (StemPro adipogenesis differentiation kit, Thermo Fisher) e condrogênica (StemPro chondrogenesis differentiation kit, Thermo Fisher).

Os procedimentos para realização das culturas celulares foram realizados de acordo com as instruções do fabricante dos meios de diferenciação (Thermo Fisher), utilizando, para isso, placas de 24 poços. Nas culturas, visando à diferenciação osteogênica e adipogênica, as células foram inoculadas com uma densidade de $9,65 \times 10^3$ células/poço e $1,93 \times 10^4$ células/poço, respectivamente, utilizando meio de cultura α -MEM. Após 24 horas, os meios de cultura foram removidos e substituídos pelos meios de diferenciação osteogênica e adipogênica, respectivamente. A diferenciação condrogênica foi realizada por cultura de micromassa, inoculando gotas de 5 μ L de meio α -MEM contendo $8,0 \times 10^4$ células, aos poços da placa. Após 2 horas, foi adicionado meio para diferenciação condrogênica. Foram realizadas culturas controle, seguindo os mesmos parâmetros das culturas de diferenciação, porém utilizando o meio α -MEM. As culturas foram mantidas por 21 dias, sendo realizadas trocas dos meios a cada 3-4 dias. Os experimentos foram desenvolvidos em triplicada.

Decorrido o período do teste, as células foram lavadas com 0,1 M de tampão fosfato (Synth) e fixadas com 4% de paraformaldeído (Dinâmica), durante 30 minutos. Nas culturas para diferenciação osteogênica, as células foram coradas utilizando 2% de vermelho de alizarina (Alphatec), por 10 minutos. As células destinadas a diferenciação adipogênica foram desidratadas em 60% de isopropanol (Synth) durante 5 minutos e coradas com 0,5% de solução de Oil Red O (Sigma-Aldrich), por 20 minutos. Para diferenciação condrogênica, foi utilizada a coloração ácido periódico-Schiff (PAS) e toluidina (Synth). Nesta técnica, as culturas foram

incubadas com 0,5% de ácido periódico (Becto), por 15 minutos, coradas com reativo de Schiff (Becto), durante 30 minutos e contra coloradas com hematoxilina de Harris (Becto) durante 2 minutos (DEUS *et al.*, 2012). Após as colorações, as culturas foram observadas por microscopia de luz com contraste de fase, ao microscópio invertido (Zeiss, Axiovert A1).

4.3.4 Análise cariotípica

A avaliação da estabilidade cromossômica das células mantidas em cultura (passagem 4 e 5) foi realizada pela análise cariotípica. As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular de 25 cm². Após a observação ao microscópio invertido com contraste de fase (Zeiss, Axiovert A1) de um grande número de divisões celulares, foi adicionada à garrafa solução de 0,10 µg/mL de colchicina (Sigma-Aldrich), em meio de cultura. Seguidamente, a garrafa foi incubada por 6 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Posteriormente, as células foram tripsinizadas com uma solução de 0,25% tripsina/0,02% EDTA e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionada solução de 0,075M de cloreto de potássio, por 12 min. Em seguida, foi acrescentada solução fixadora de metanol-ácido acético (Synth), na proporção 3:1, e foi realizada a centrifugação, descarte do sobrenadante e adição de solução fixadora, por 30 min. Transcorrido esse período, a solução foi mantida em geladeira a 4 °C por pelo menos 1 hora. Posteriormente, a solução foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionada nova solução fixadora.

Em lâminas lavadas e mantidas em geladeira a 4 °C por 2 horas, foi gotejada a suspensão de células. As lâminas foram deixadas para secar e, em seguida, coradas com 5% de Giemsa por 5 minutos. A observação e contagem dos cromossomos foram efetuadas por microscopia de luz (Axio Imager 2, Zeiss). Foram realizadas as contagens de 30 cariótipos celulares (MASSON & LOMBELLO, 2016).

4.4 Congelamento das células-tronco

Alíquotas das SHED (primeira a terceira passagem) foram congeladas para serem posteriormente utilizadas nos experimentos. Primeiramente, as células foram

tripsinizadas com uma solução de 0,25% tripsina/0,02% EDTA e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão com meio de cultura completo, contendo 5% a 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A suspensão das SHED foi transferida para tubos criogênicos, os quais foram colocados em freezer a -80 °C por 24 horas. Após o período, os tubos foram armazenados em nitrogênio líquido.

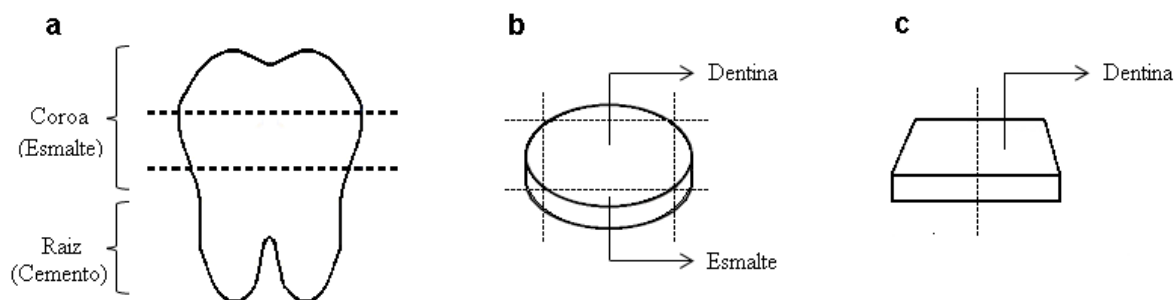
4.5 Descongelamento das células-tronco

Para utilização nos experimentos, primeiramente as SHED foram descongeladas. Os tubos criogênicos, contendo as células congeladas, foram retirados do nitrogênio líquido e rapidamente colocados em banho-maria a 37 °C. Após o descongelamento, o conteúdo dos tubos foi aspirado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão com meio de cultura completo. A solução de células foi transferida para um frasco de cultura e mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias.

4.6 Preparo do arcabouço de dentina

Os dentes permanentes molares, utilizados para a obtenção dos arcabouços de dentina, foram cedidos pelo Biobanco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os dentes foram fixados nos suportes (placas de acrílico), com cera para escultura de prótese fixa pegajosa (Kota), para a realização dos cortes. A região da coroa dos dentes foi cortada transversalmente (Figura 3a) com uma espessura de aproximadamente 2 mm, empregando-se o micromotor. Em seguida, as fatias dos dentes foram novamente fixadas nos suportes e cortadas para remoção da camada externa de esmalte (Figura 3b). Os blocos de dentina obtidos foram cortados ao meio (Figura 3c) e lixados com lixa D'Água 320 (3M), para retirada das marcas de corte e do resto da camada de esmalte.

Figura 3 - Esquemas com os cortes realizados nos dentes para a obtenção das frações de dentina (A, B e C). As linhas tracejadas indicam as regiões dos cortes.



Fonte: Própria.

As frações de dentina obtidas foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos: controle, tratamento 1, tratamento 2 e tratamento 3. As amostras do grupo controle não passaram por nenhum tratamento para desmineralização após serem cortadas e lixadas.

No grupo tratamento 1, as amostras foram submetidas à lavagem com água destilada durante 5 horas, utilizando a cuba ultrassônica (Cristófoli). Neste procedimento, foram efetuadas cinco lavagens de 20 minutos com sonicação e 40 minutos sem sonicação. A água destilada foi trocada a cada hora. Após a limpeza ultrassônica, as amostras de dentina foram imersas em solução de 17% (pH 8,9), 10% (pH 9,0) e 5% (pH 9,1) de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) (Êxodo Científica), durante 5 minutos, sendo realizadas lavagens com água destilada durante 10 minutos, na cuba ultrassônica, entre as mudanças das concentrações de EDTA (LI *et al.*, 2011).

As amostras do grupo tratamento 2 foram imersas em solução de 17% de EDTA (pH 8,9), durante 10 minutos e, em seguida, ficaram 1 minuto em solução de 19% de ácido cítrico (pH 2,2) (CAAL) (TRAN *et al.*, 2015).

No grupo tratamento 3, as amostras foram deixadas submersas em solução de ácido clorídrico (Synth) 0,6 N (pH 1,3), por 7 dias (YAGIHASHI *et al.*, 2009; TOGARI *et al.*, 201).

Após os tratamentos, as amostras dos quatro grupos foram lavadas com água destilada durante 5 minutos utilizando a cuba ultrassônica e, em seguida, mantidas por 48 horas em água destilada para remoção dos agentes desmineralizantes.

Para finalização do preparo dos arcabouços, as amostras foram esterilizadas por radiação gama, com uma dose de 25 kGy (TRAN *et al.*, 2015), no irradiador multipropósito de cobalto-60 do IPEN-CNEN/SP.

A avaliação do efeito da radiação sobre os arcabouços foi realizada pela técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no modo de reflexão total atenuada (*attenuated total reflectance - ATR*), utilizando o espectrômetro FTIR (Frontier, PerkinElmer). Foram realizadas medições em oito amostras de dentina (grupo controle) antes e após o procedimento de esterilização. No momento da aquisição dos dados, foram feitas 60 varreduras de cada amostra, na resolução de 4 cm^{-1} . A faixa dos espectros coletados foi entre 700 a 4000 cm^{-1} .

Após a obtenção dos dados, foi realizada uma análise qualitativa descritiva dos espectros obtidos de cada grupo dos arcabouços. Para análise semi-quantitativa foi, primeiramente, efetuado o cálculo das áreas sob as bandas de absorção por meio do software MATLAB, sendo a normalização feita pela banda de absorção correspondente ao modo de vibração ν_3 do fosfato (ZEZELL *et al.*, 2015). A avaliação foi desenvolvida por meio da identificação de mudanças relativas entre as áreas de diferentes bandas de absorção dos espectros: entre 800 cm^{-1} e 887 cm^{-1} para ν_2 carbonato, entre 887 cm^{-1} e 1181 cm^{-1} para ν_3 do fosfato; entre 1181 cm^{-1} e 1296 cm^{-1} para amida III; entre 1300 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} para ν_3 carbonato; entre 1510 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} para amida II, entre 1593 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} para amida I e, entre 2902 cm^{-1} e 3690 cm^{-1} para OH^- .

4.7 Caracterização do arcabouço de dentina

4.7.1 Avaliação da perda de massa

Para avaliação da perda de massa, cinco amostras de cada grupo foram secas e pesadas, utilizando balança analítica (Marte Shimadzu, AY 220), antes da realização dos procedimentos de preparo (tópico 4.6).

Após os tratamentos, as amostras foram deixadas secar por 1 hora e pesadas novamente. A quantificação da porcentagem de perda de massa foi realizada através da equação 1.

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \quad (1)$$

Onde a massa inicial (M_i) corresponde a primeira pesagem e a massa final (M_f) equivale a pesagem após os tratamentos.

4.7.2 *Análise da estrutura*

A análise da estrutura dos arcabouços de dentina foi realizada por MEV. Para o ensaio, amostras de dentina de cada grupo foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm por *sputtering* e observadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura.

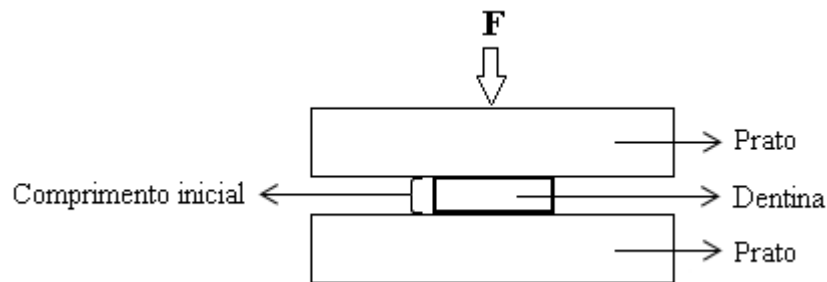
4.7.3 *Avaliação por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier*

A avaliação da desmineralização dos quatro grupos experimentais foi realizada pela técnica de FTIR, seguindo os mesmos parâmetros da avaliação do efeito da esterilização por radiação gama (tópico 4.6). Os experimentos foram desenvolvidos com 19 amostras de cada grupo experimental.

4.7.4 *Avaliação da resistência à compressão*

Para avaliação da resistência mecânica dos arcabouços, foram realizados ensaios de compressão. Os testes foram efetuados em uma máquina universal para ensaios mecânicos (EMIC, linha DL), com um par de pratos paralelos horizontais (Figura 4) e uma célula de carga de 500 kg. A velocidade foi ajustada em 0,1 mm/minuto e os experimentos foram realizados em duplicata (NYMAN *et al.*, 2008; CHUN *et al.*, 2014). O comprimento inicial médio das amostras foi de 1,5 mm e a área inicial foi de 13,8 mm².

Figura 4 - Imagem ilustrativa do ensaio de compressão das amostras de dentina (F: força da carga aplicada).



Fonte: Própria

As tensões de compressão (σ em MPa) e as deformações (ϵ) das amostras de dentina foram calculadas usando, respectivamente, as equações (2) e (3).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2)$$

Onde σ representa a tensão, F a carga instantânea aplicada em uma direção perpendicular à seção transversal da amostra e A a área inicial da seção transversal da amostra.

$$\epsilon = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} = \frac{\Delta C}{C_i} \quad (3)$$

Onde ϵ representa a deformação, C_i o comprimento inicial, C_f o comprimento instantâneo e ΔC a variação de comprimento em um dado instante, em referência ao comprimento inicial.

4.7.5 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade das amostras foi avaliada por espectrofotometria do sal de tetrazólio, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). O MTT é um teste colorimétrico utilizado para medir a atividade mitocondrial em células viáveis, através da redução do sal MTT, pelas enzimas mitocondriais, para cristais de formazan (MOSMANN, 1983). Desta forma, o ensaio de MTT avalia indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células viáveis.

No ensaio, os extratos da dentina foram preparados deixando amostras de cada grupo experimental incubando em meio de cultura α -MEM (0,2 g/mL), a 37 °C durante 24 horas. As células foram inoculadas com uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço em uma placa de cultura de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada em estufa por 24 horas. Decorrido o período, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 μ L dos extratos previamente preparados. Como controle positivo (citotóxico), foi utilizado meio de cultura com 0,25% de fenol e como controle negativo, não citotóxico, foi utilizado o meio de cultura regular.

Após 24 horas, a morfologia geral das células foi avaliada por microscopia de luz com contraste de fase, ao microscópio invertido (Zeiss, Axiovert A1). Seguidamente, os meios de cultura (extratos) foram removidos e foi adicionada uma solução contendo 100 μ L de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich) (0,5 mg/mL). A placa foi incubada por três horas em estufa. Decorrido esse período, o MTT foi retirado e 50 μ L de dimetilsulfóxido (Synth) foram adicionados. O controle branco foi realizado de forma semelhante, mas sem a adição de células aos poços. Em seguida, foi efetuada a leitura da absorbância a 570 nm. Os experimentos foram realizados em quintuplicada (MOSMANN, 1983; ISO 10993-5, 2009).

A porcentagem da viabilidade celular das culturas sob a influência dos extratos foi calculada considerando a média da absorbância do controle negativo como 100% de células viáveis, conforme descrito na equação 4.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = 100 \frac{Ae570}{Acn570} \quad (4)$$

Onde Ae570 representa o valor da absorbância para cada extrato, medido a 570 nm e Acn570 reproduz o valor da média de absorbância para o controle negativo, medido a 570 nm.

4.8 Análise da interação entre as células-tronco e a dentina

A análise da interação das células com o arcabouço foi efetuada através de imagens obtidas por MEV. Para os ensaios biológicos, as células foram inoculadas sobre as amostras de dentina com uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/arcabouço. As

culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 horas, 3 e 21 dias. A manutenção das células foi realizada com meio de cultura α -MEM, contendo 10% de SFB e 100 μ g/mL de penicilina/estreptomicina (LOMBELLO *et al.*, 2000).

Após os períodos de incubação, as culturas foram preparadas de modo semelhante à análise das polpas (tópico 4.2).

4.9 Análise estatística

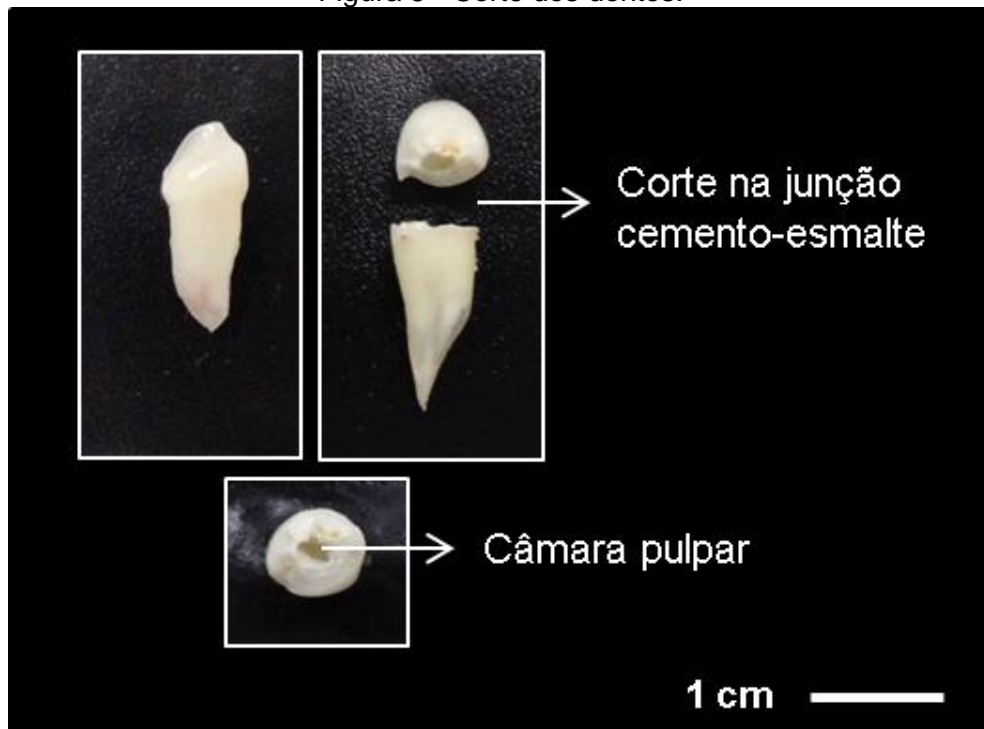
A análise estatística foi executada utilizando os programas GraphPad Prism 7 e Microsoft Excel. Os ensaios estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5%. Para determinação do teste a ser utilizado, foram verificados a normalidade dos dados, pelo teste Shapiro-Wilk, e a igualdade entre as variâncias, pelo teste Levene. Dados com distribuição normal e igualdade de variâncias foram avaliados utilizando o teste *t* de Student (dois grupos) ou a análise de variâncias (ANOVA, para mais de três grupos), seguida do pós-teste de Tukey, caso contrário, os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e o pós-teste Dunn.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção e análise das polpas dentárias

Após a obtenção dos dentes humanos decíduos, foi verificado se estes estavam íntegros e se era necessário à realização de cortes para exposição da câmara pulpar (Figura 5).

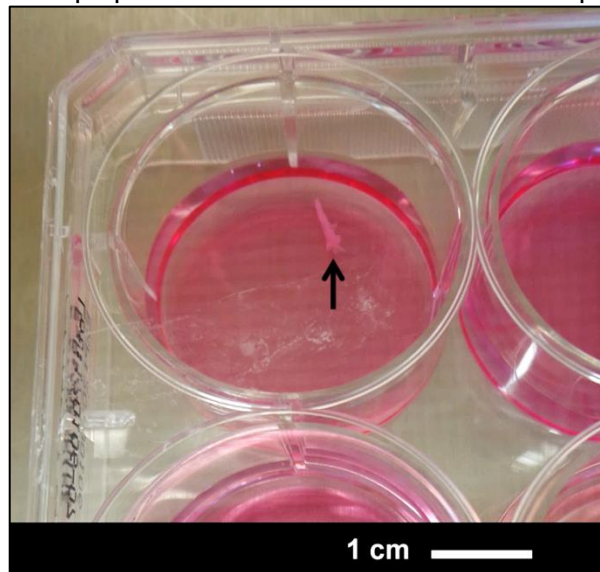
Figura 5 - Corte dos dentes.



Fonte: Própria.

Com a remoção das polpas, foi verificado que estas tinham uma estrutura gelatinosa, com consistência viscosa e uma coloração esbranquiçada (Figura 6).

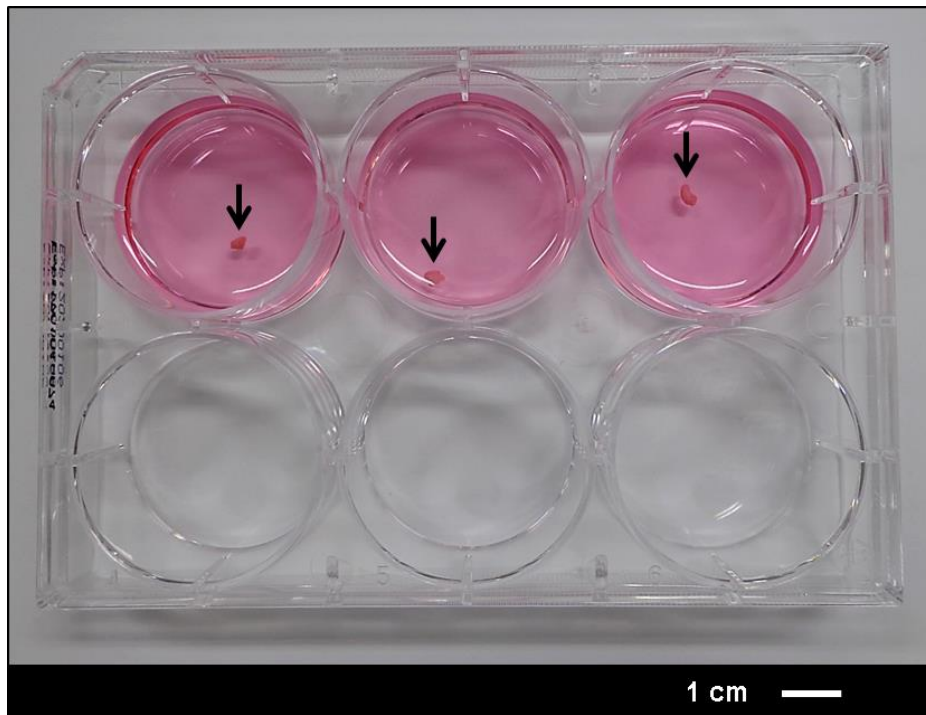
Figura 6 - Tecido pulpar recém-extraído. A seta indica a polpa dentária.



Fonte: Própria.

Foram realizadas análises visuais dos tecidos pulpares, tratados ou não com tripsina, e foi observado que as polpas se mantiveram íntegras durante os 35 dias de cultura (Figura 7), para extração das SHED.

Figura 7 - Placa de cultura de seis poços com as polpas dentárias. As setas indicam as polpas.

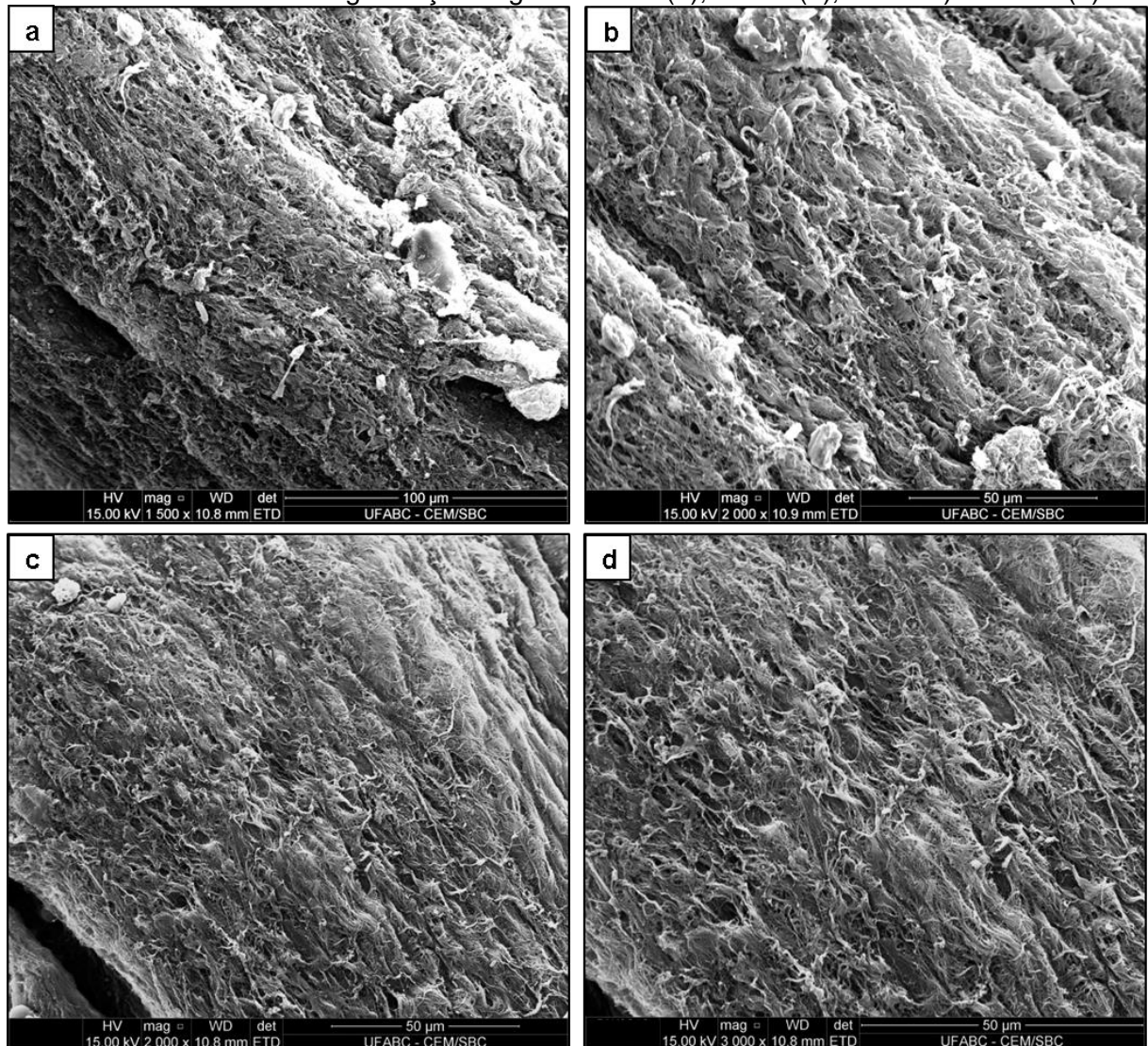


Fonte: Própria.

As polpas também foram analisadas por MEV. No teste foram observadas as amostras das polpas recém-extraídas do dente (Figura 8) e as amostras que permaneceram 35 dias em cultura (Figuras 9, 10 e 11).

A inspeção da polpa recém-extraída e sem tratamento enzimático revelou um tecido com uma densa matriz extracelular de numerosas fibras (Figura 8). Na maior parte da área da polpa, as fibras não exibiam uma orientação particular e não foi possível a distinção de células no tecido pulpar.

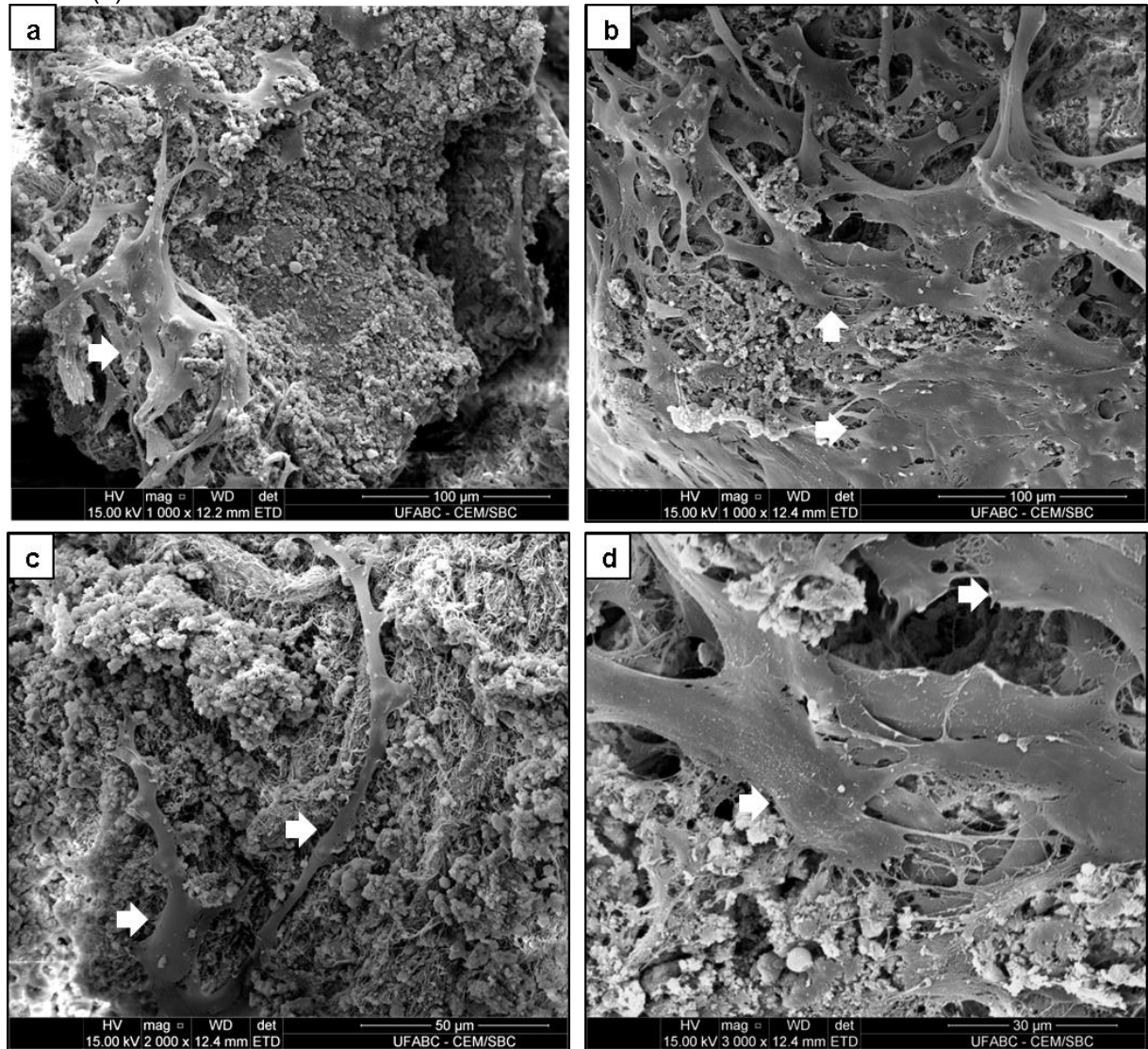
Figura 8 - Polpa dentária recém-extraída de dente decíduo, observada por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1500x (a); 2000x (b); 2000x (c) e 3000x (d).



Fonte: Própria.

A polpa que permaneceu em cultura e que não foi previamente tratada com tripsina apresentou uma matriz mais compacta. No entanto, foi possível a observação de células na superfície do tecido (Figura 9).

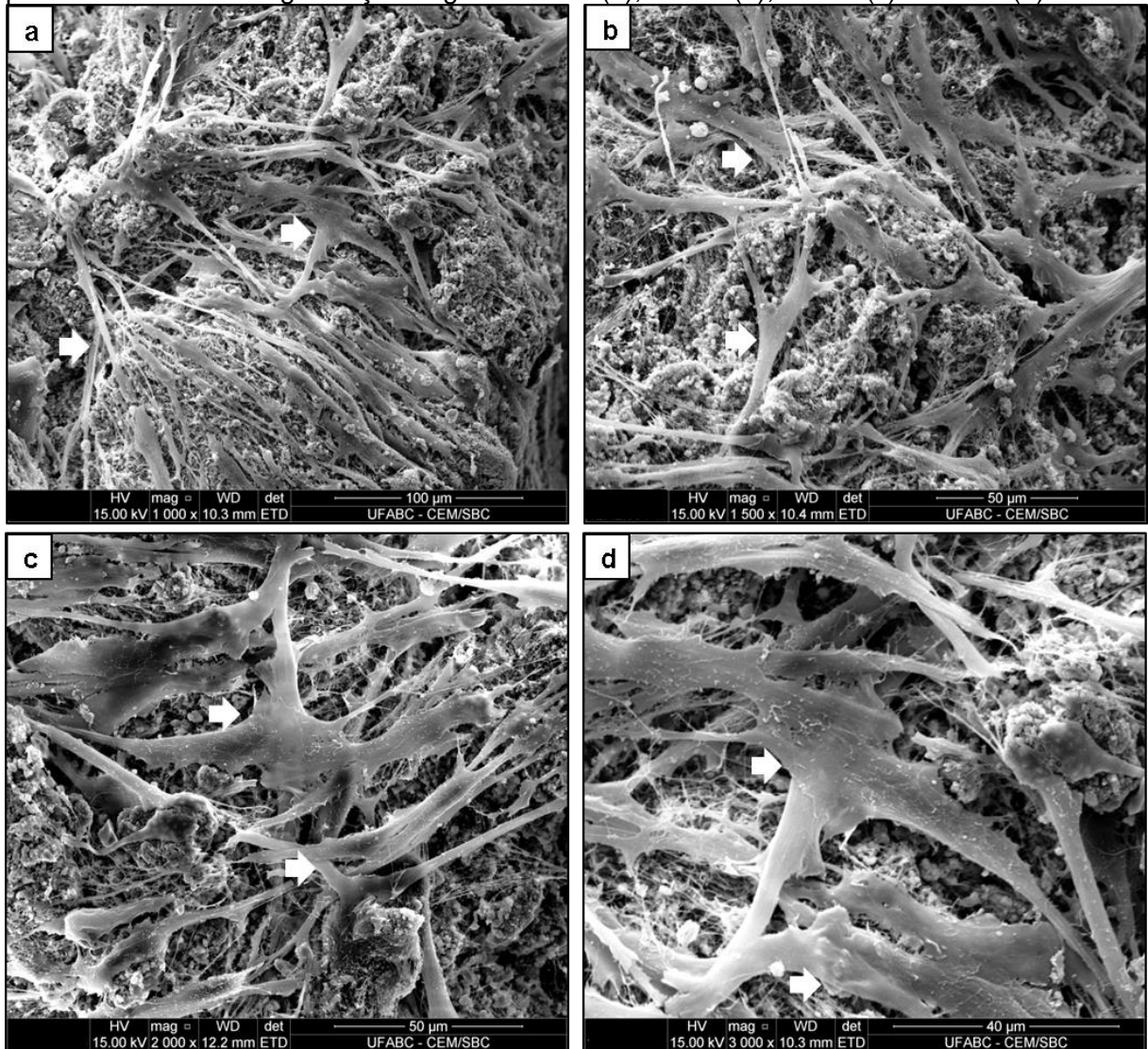
Figura 9 – Polpa dentária após 35 dias de cultura, sem processamento enzimático prévio, observada por microscopia eletrônica de varredura. As células na superfície do tecido estão evidenciadas por setas brancas. Magnificação original: 1000x (a); 1000x (b); 2000x (c) e 3000x (d).



Fonte: Própria.

Com a observação da polpa tratada com tripsina e mantida em cultura, foi averiguada uma grande quantidade de células entrelaçada na superfície do tecido (Figura 10).

Figura 10 – Polpa dentária após 35 dias de cultura, tratada com tripsina, observada por microscopia eletrônica de varredura. As células na superfície do tecido estão evidenciadas por setas brancas. Magnificação original: 1000x (a); 1500x (a); 2000x (c) e 3000x (d).



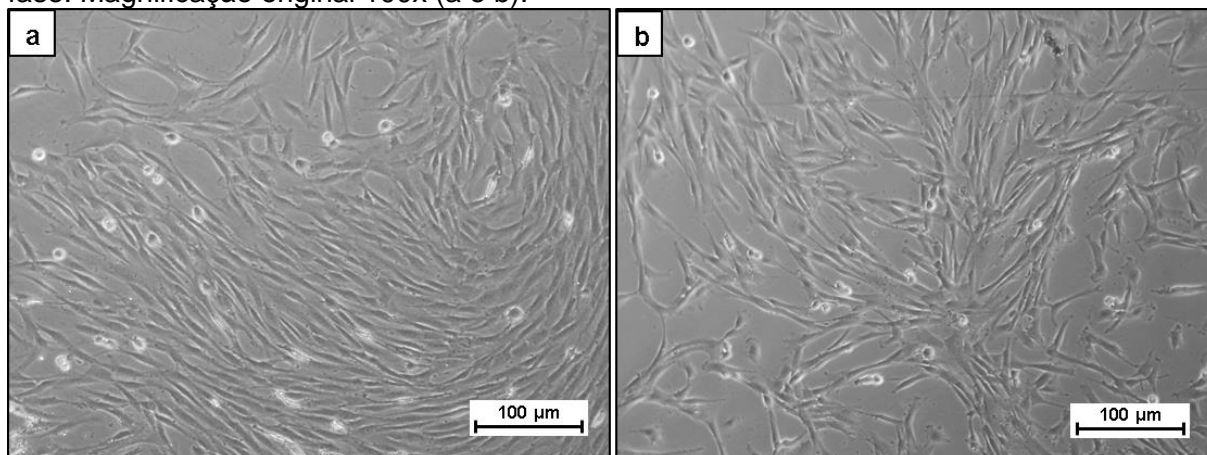
Fonte: Própria.

5.2 Caracterização das células-tronco

5.2.1 Adesão e morfologia celular

Foi observado que, após 2 semanas de cultura, os poços contendo as polpas tratadas com tripsina já apresentavam agrupamentos de células (Figura 11a). Nos poços com a polpa sem digestão enzimática, os agrupamentos de células foram observados após 4 semanas (Figura 11b). Nos testes subsequentes realizados foram utilizadas as células obtidas das polpas tratadas com tripsina.

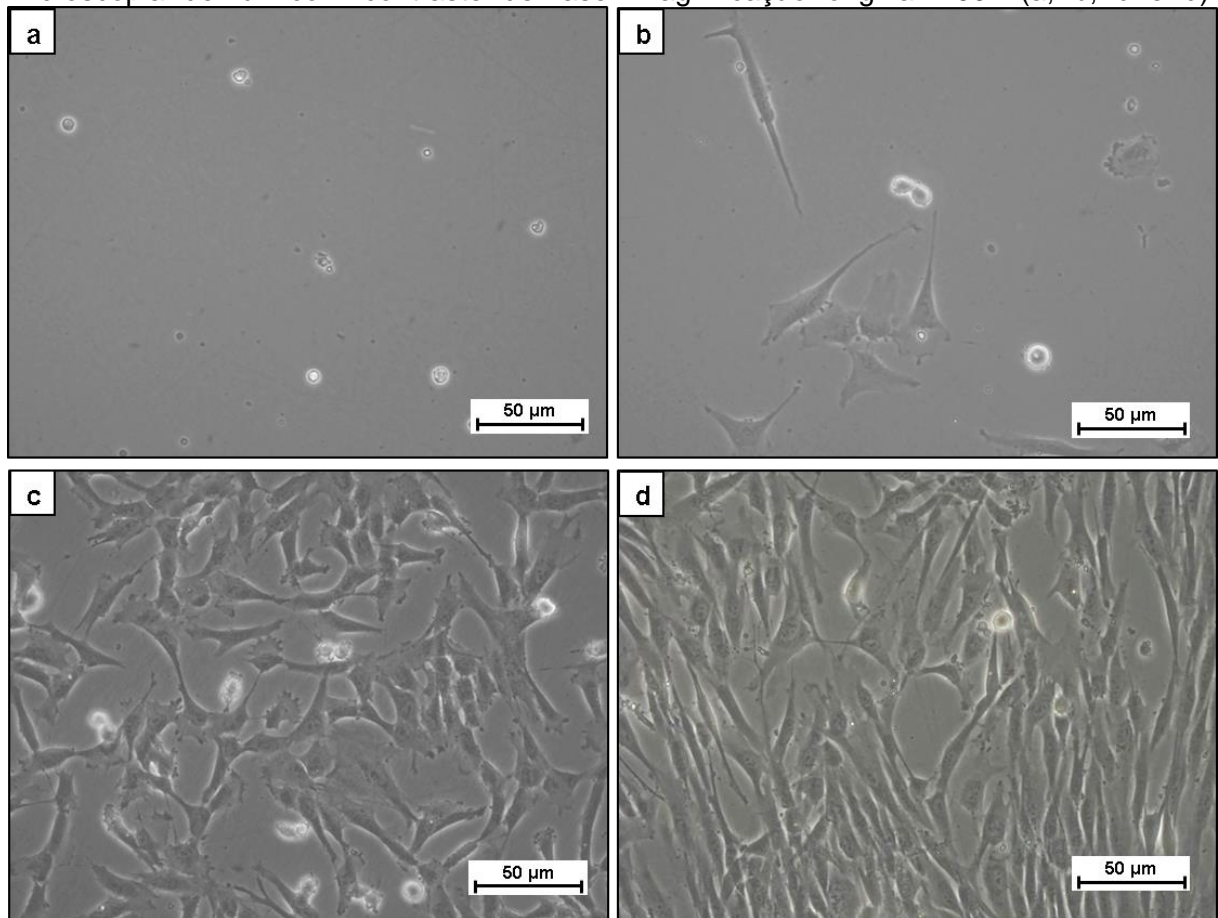
Figura 11 - Células liberadas das polpas tratadas com tripsina (a). Células liberadas da polpa sem digestão enzimática (b). Observação por microscopia de luz com contraste de fase. Magnificação original 100x (a e b).



Fonte: Própria.

As células liberadas das polpas inicialmente apresentavam morfologia arredondada (Figura 12a). Foi observado que essas células se espalharam pela placa de cultura exibindo uma morfologia mais alongada e eram encontradas em pequenos agrupamentos (Figura 12b). Com o passar dos dias em cultura, a densidade de células aumentou nos aglomerados (Figura 12c e d).

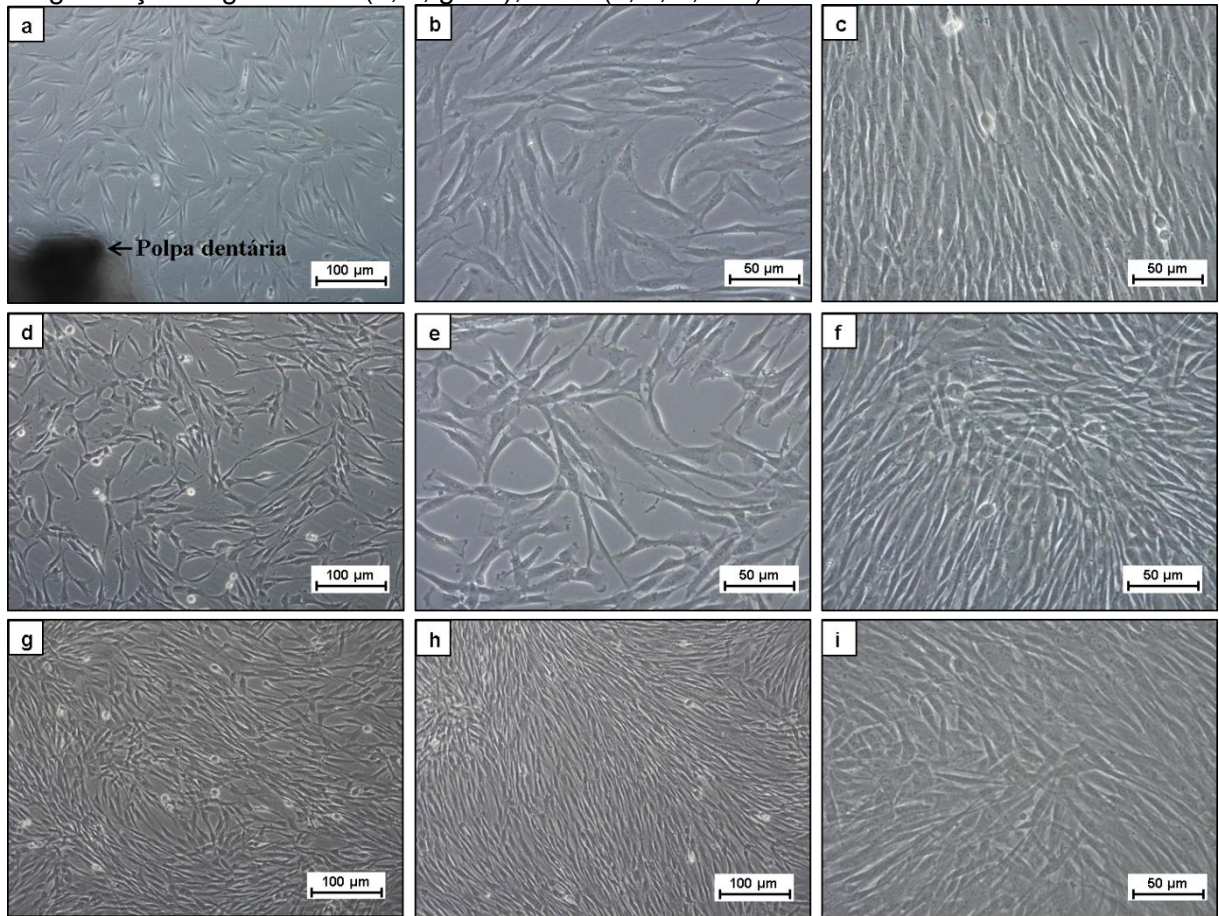
Figura 12 - Células liberadas pela polpa dentária na passagem 0. Observação por microscopia de luz com contraste de fase. Magnificação original 200x (a, b, c e d).



Fonte: Própria.

As células mantiveram sua adesão aos frascos de cultura mesmo após os subcultivos (Figura 13). Essas células possuíam morfologia típica das células-tronco mesenquimais, exibindo uma forma alongada. Ao atingirem alta confluência, foi observado que as células se sobrepunham e a cultura adquiria o padrão de crescimento de múltiplas camadas (Figura 13 f e i).

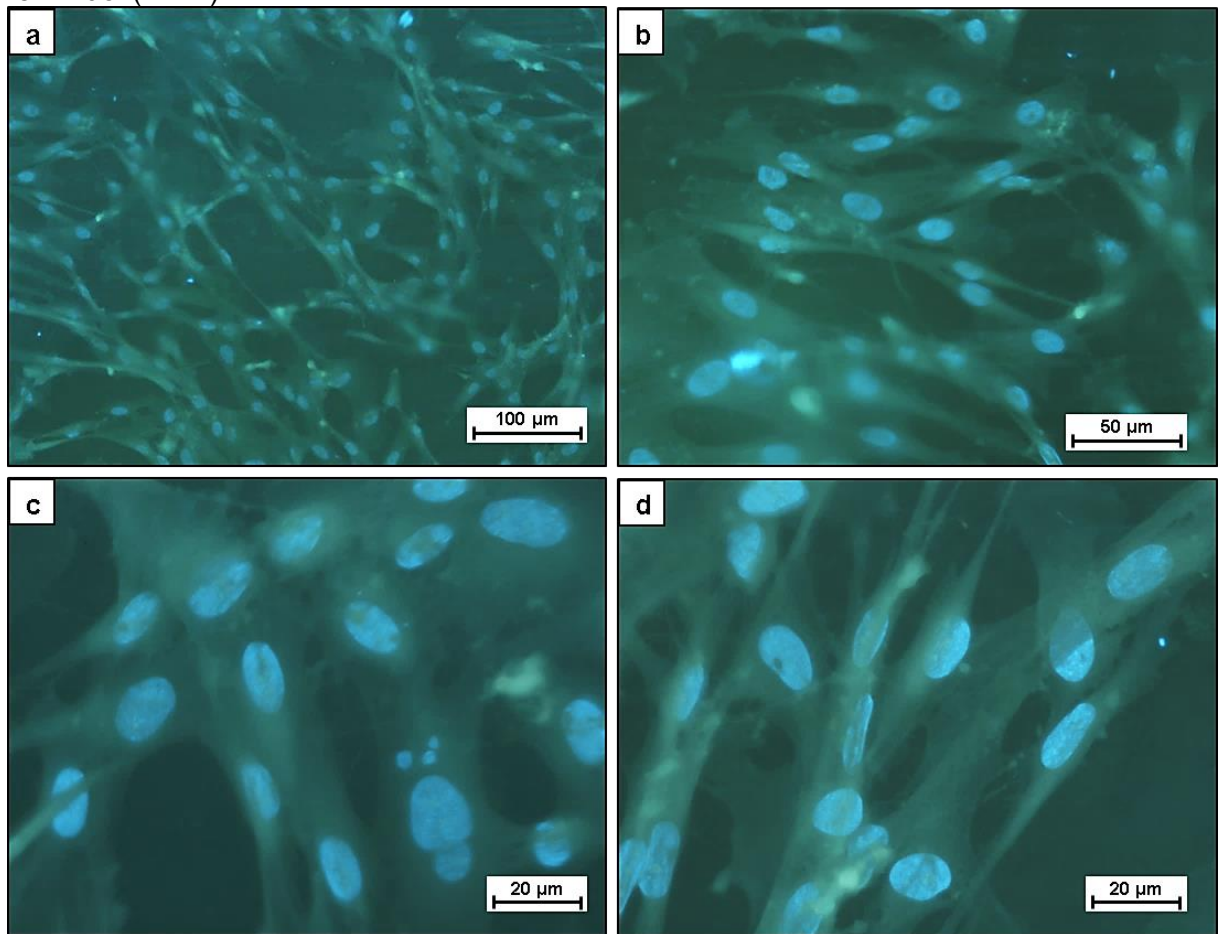
Figura 13 - Células observadas por microscopia de luz com contraste de fase. Células passagem 0 (a, b e c). Células passagem 1 (d, e e f). Células passagem 2 (g, h e i). Magnificação original 100x (a, d, g e h), 200x (b, c, e, f e i).



Fonte: Própria.

Com a análise por microscopia de fluorescência, após as células serem coradas com DAPI, foi possível observar com destaque os núcleos redondos ou ovais e a organização em multicamadas (Figura 14).

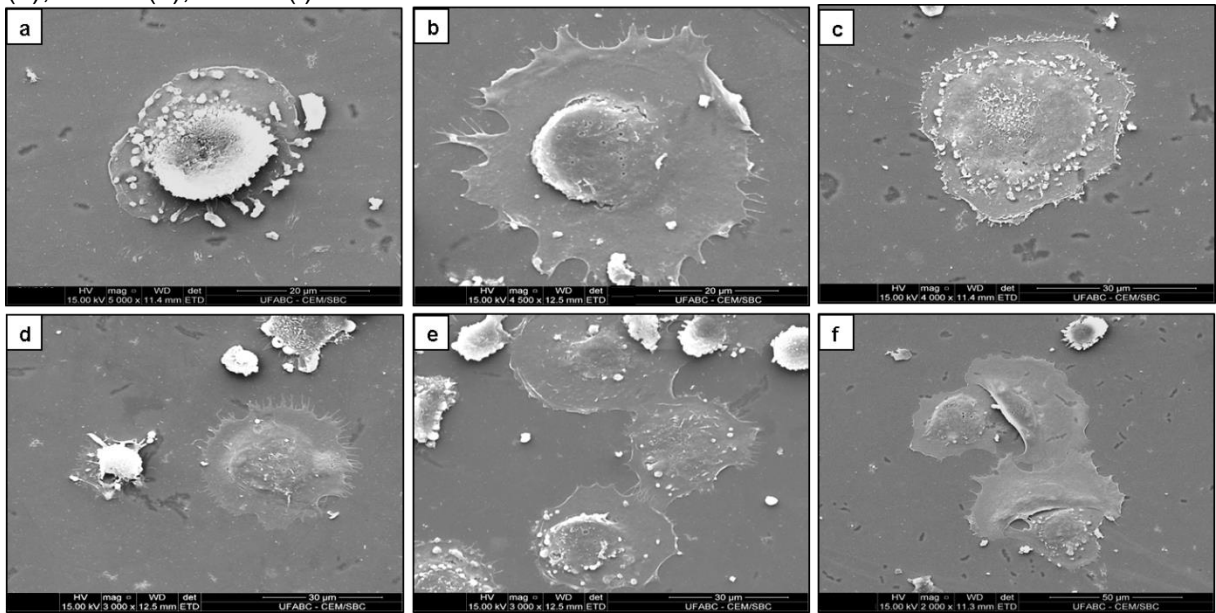
Figura 14 - Células observadas por microscopia de fluorescência, após 3 dias de cultura. Magnificação original 100x (a), 200x (b), 400x (c e d). Células coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).



Fonte: Própria.

Com a observação por MEV foi possível verificar o processo de adesão celular (após duas horas de cultura), no qual as células em suspensão (morfologia arredondada) começavam a interagir com a superfície do substrato (lamínulas de vidro) e adquiriam uma morfologia achatada (Figura 15).

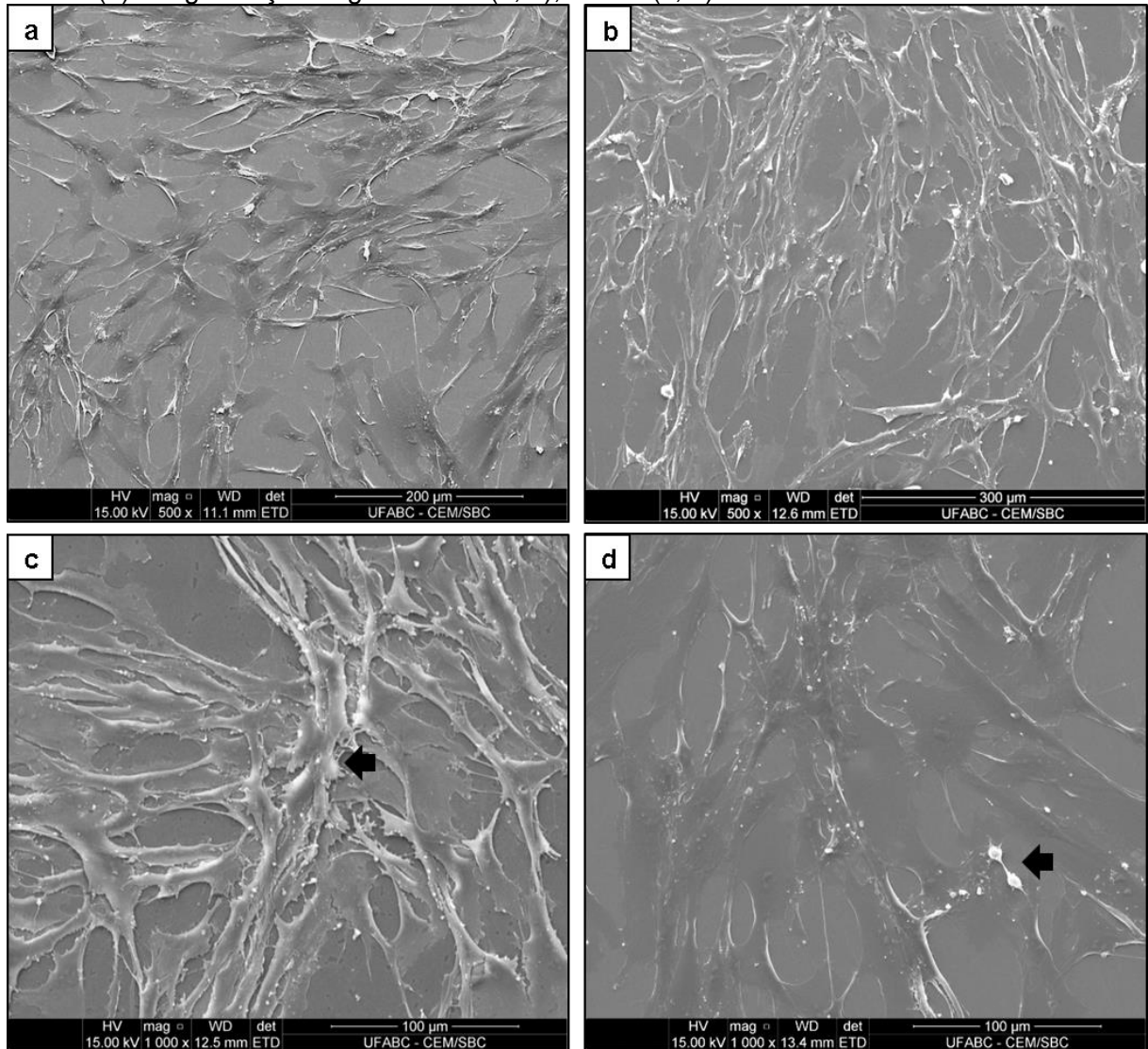
Figura 15 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 2 horas da inoculação (a, b, c, d, e e f). Magnificação original: 5000x (a), 4500x (b), 4000x (c), 3000x (d), 3000x (e), 2000x (f).



Fonte: Própria.

As células também foram observadas por MEV após 3 dias de cultura, para examinar o crescimento celular. As células apresentavam-se achatadas e alongadas sobre o substrato (Figura 16a e b), sendo possível verificar o crescimento em multicamadas (Figura 16c). Foi possível ainda averiguar células em divisão (Figura 16 d).

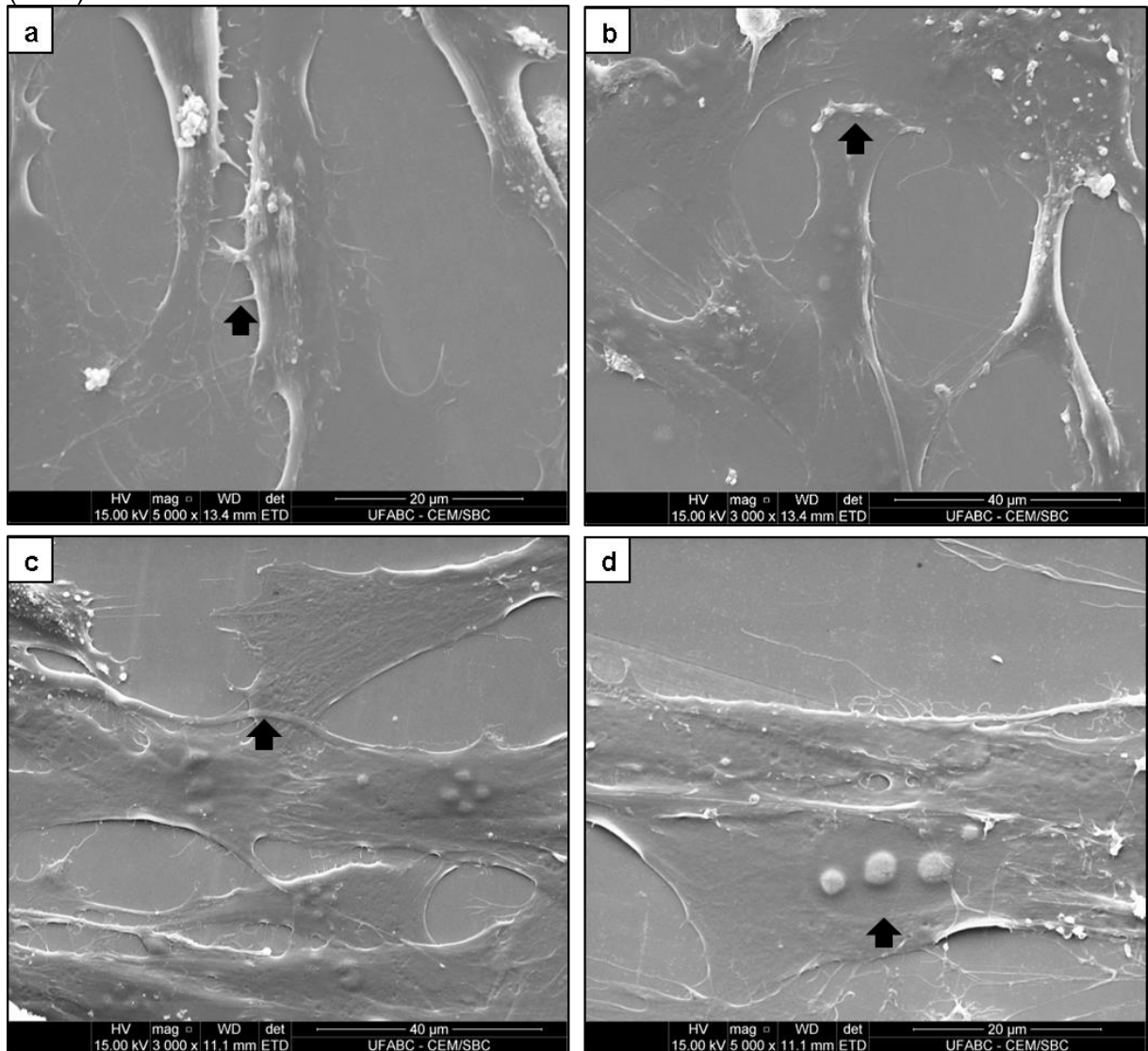
Figura 16 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 3 dias da inoculação (a, b, c e d). As setas indicam o crescimento em multicamadas (c) e divisão celular (d). Magnificação original: 500x (a, b), 1000x (c, d).



Fonte: Própria.

Na região de contato das células com a lamínula de vidro, foram visualizadas estruturas protrusivas com formas de finas extensões, os filopódios (Figura 17a) e, em formato de folhas, os lamelipódios (Figura 17b). Na Figura 17c é possível verificar com detalhes uma região de contato entre duas células e o crescimento sobreposto das células. O núcleo oval, contendo múltiplos nucléolos, também foi observado com ênfase (Figura 17d).

Figura 17 – Células observadas por microscopia eletrônica de varredura, após 3 dias da inoculação (a, b, c e d). As setas indicam as estruturas protrusivas das células (a e b), uma região de contato entre células (c) e o núcleo (d). Magnificação original: 5000x (a e d), 3000x (b e c).

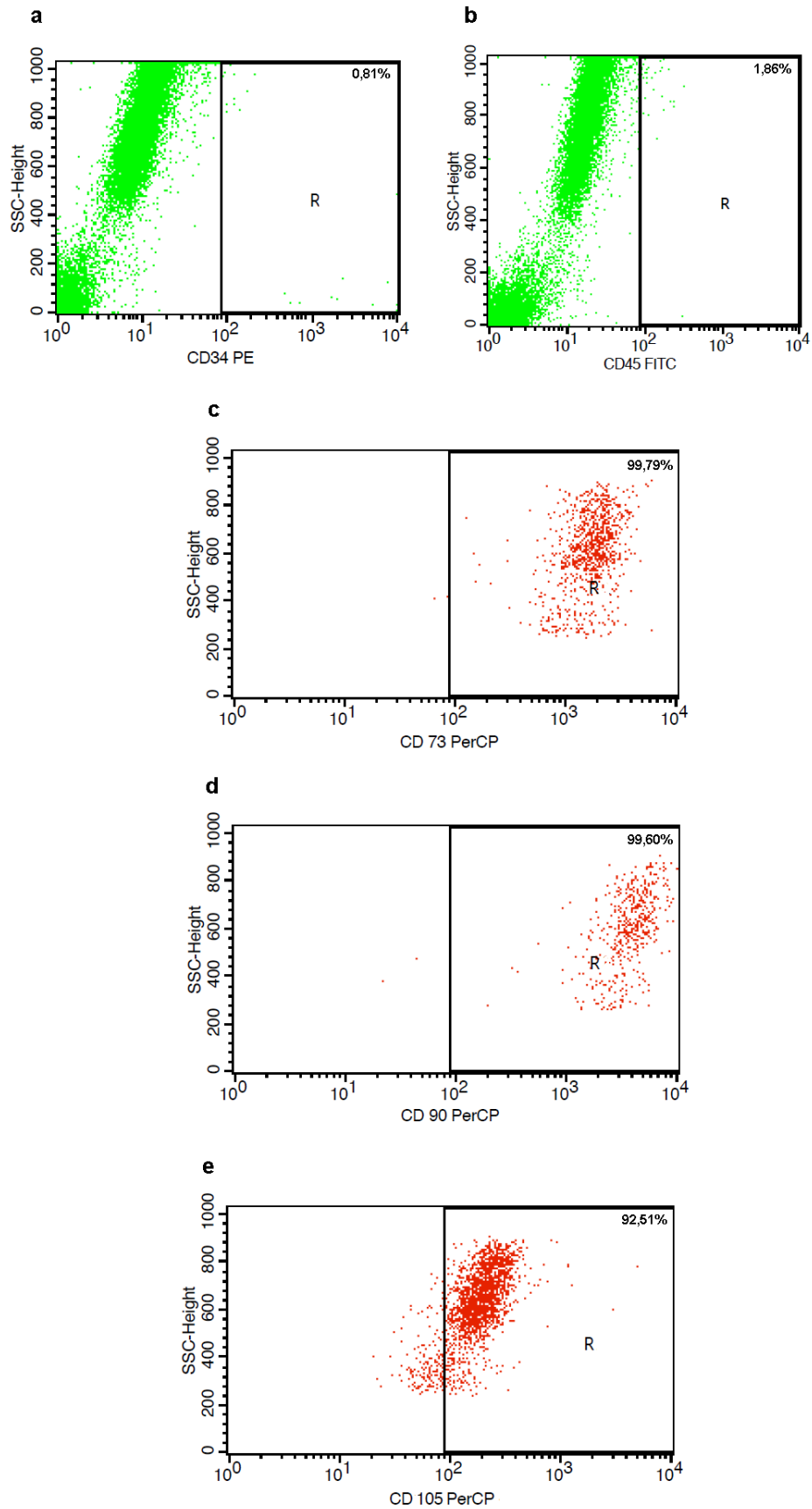


Fonte: Própria.

5.2.2 Análise de antígenos de superfície por citometria de fluxo

As expressões dos marcadores CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105 estão representadas nos gráficos da Figura 18.

Figura 18 - Citometria de fluxo das células da polpa obtidas do tratamento com tripsina.



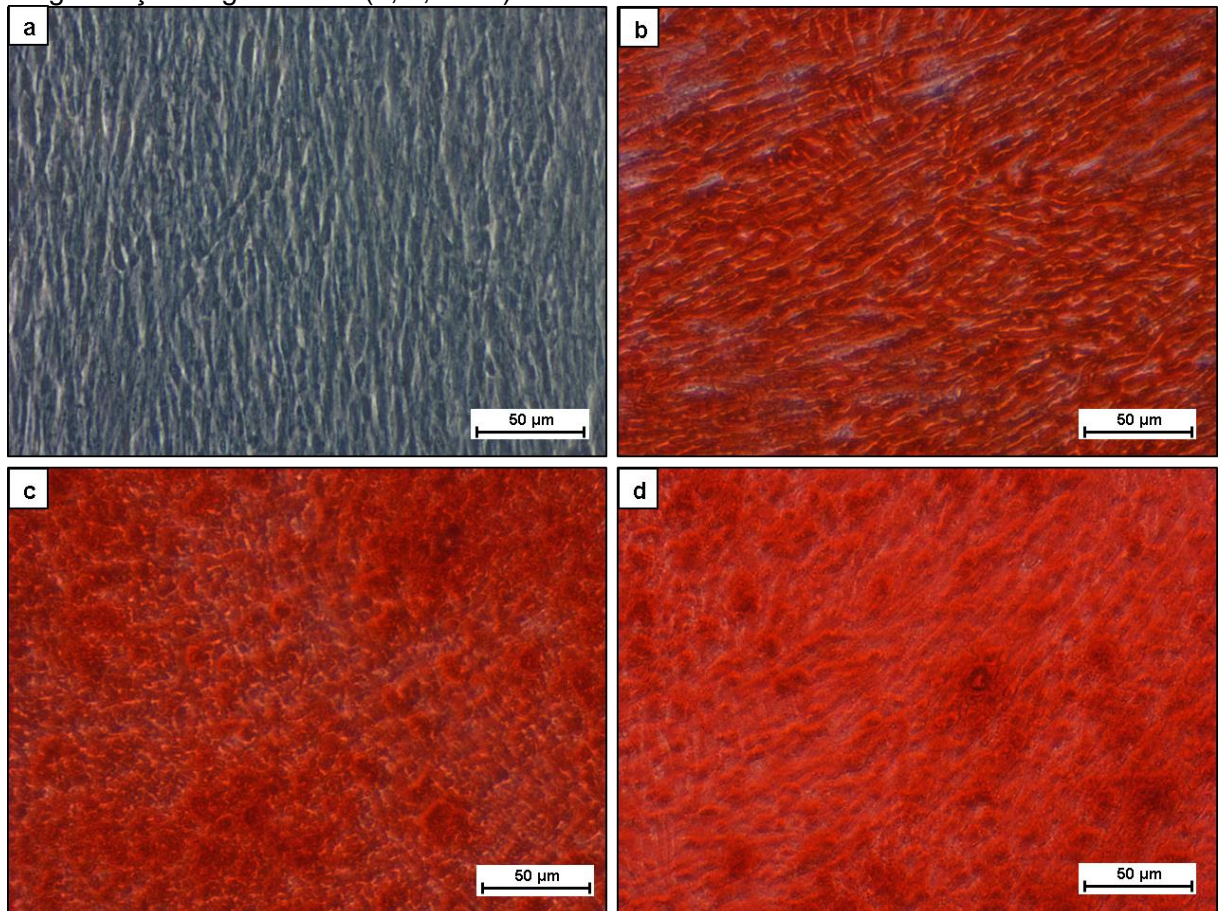
Fonte: Própria.

A amostra apresentou baixa expressão dos marcadores CD34 (Figura 18a) e CD45 (Figura 18b), sendo menos de 2% da população avaliada. A expressão dos marcadores CD73 (Figura 18c), CD90 (Figura 18d), CD105 (Figura 18e) foi mais de 90% da população.

5.2.3 Diferenciação celular

A comprovação da capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens foi observada após 21 dias, com a realização das colorações específicas para cada tipo de linhagem. A diferenciação osteogênica foi demonstrada pela deposição de cálcio na cultura, utilizando o corante vermelho de alizarina (Figura 19).

Figura 19 - Diferenciação osteogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação osteogênica (b, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Células coradas vermelho de alizarina. Magnificação original 200x (a, b, c e d).

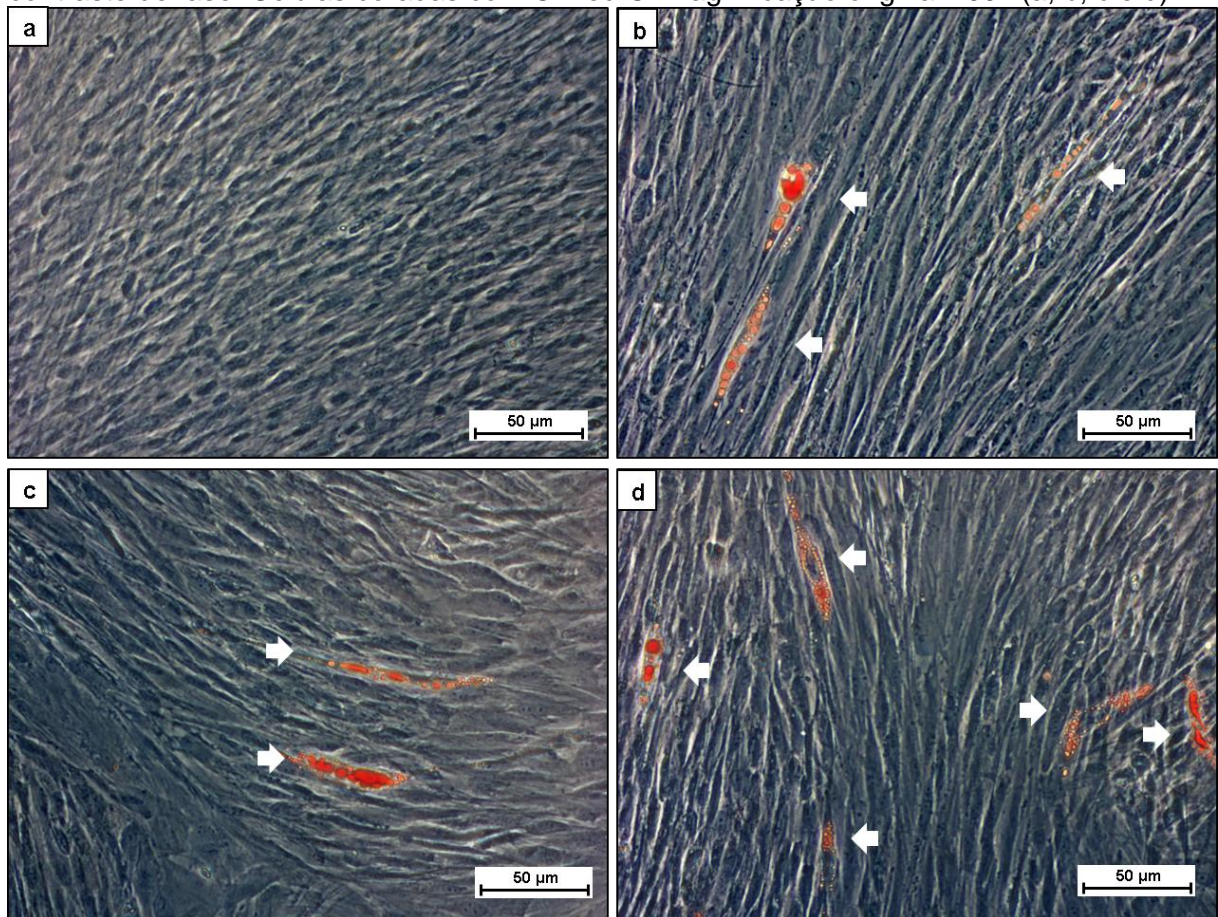


Fonte: Própria.

Na Figura 19a é possível observar que o grupo controle não exibiu coloração avermelhada, portanto não ocorreu deposição de cálcio pelas células. Contudo, nas culturas sob influência do meio para diferenciação foi verificado o acúmulo de cálcio sobre a camada de células, como evidenciado pela coloração vermelha (Figura 19b, c, e d).

A utilização do Oil Red O nas culturas para diferenciação adipogênica colaborou para a observação dos lipídios intracelulares (Figura 20).

Figura 20 - Diferenciação adipogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação adipogênica (b, c e d). As setas evidenciam os lipídios intracelulares (b, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Células coradas com Oil red O. Magnificação original 200x (a, b, c e d).

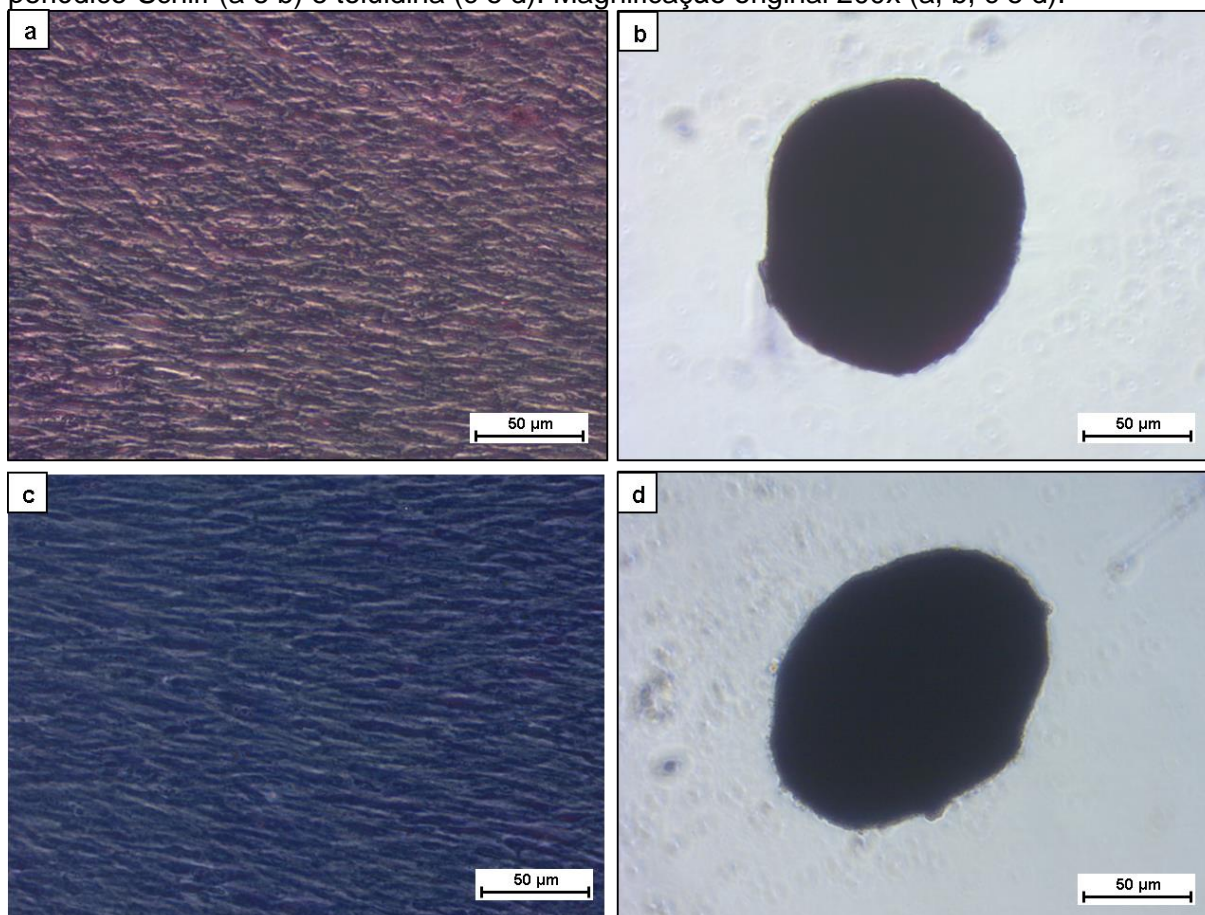


Fonte: Própria.

O grupo controle da diferenciação adipogênica (Figura 20a) não apresentou marcação para lipídios intracelulares. Na Figura 20b, c, e d é possível verificar o acúmulo lipídico no interior das células que foram induzidas a diferenciação adipogênica.

A diferenciação condrogênica foi demonstrada pela alteração no padrão de crescimento das células e através da coloração com PAS (Figura 21a e b)

Figura 21 - Diferenciação condrogênica. Controle, células cultivadas com meio α -MEM (a e c). Células cultivadas com meio indutor da diferenciação condrogênica (b e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase (a, b, c e d). Células coradas com ácido periódico-Schiff (a e b) e toluidina (c e d). Magnificação original 200x (a, b, c e d).



Fonte: Própria.

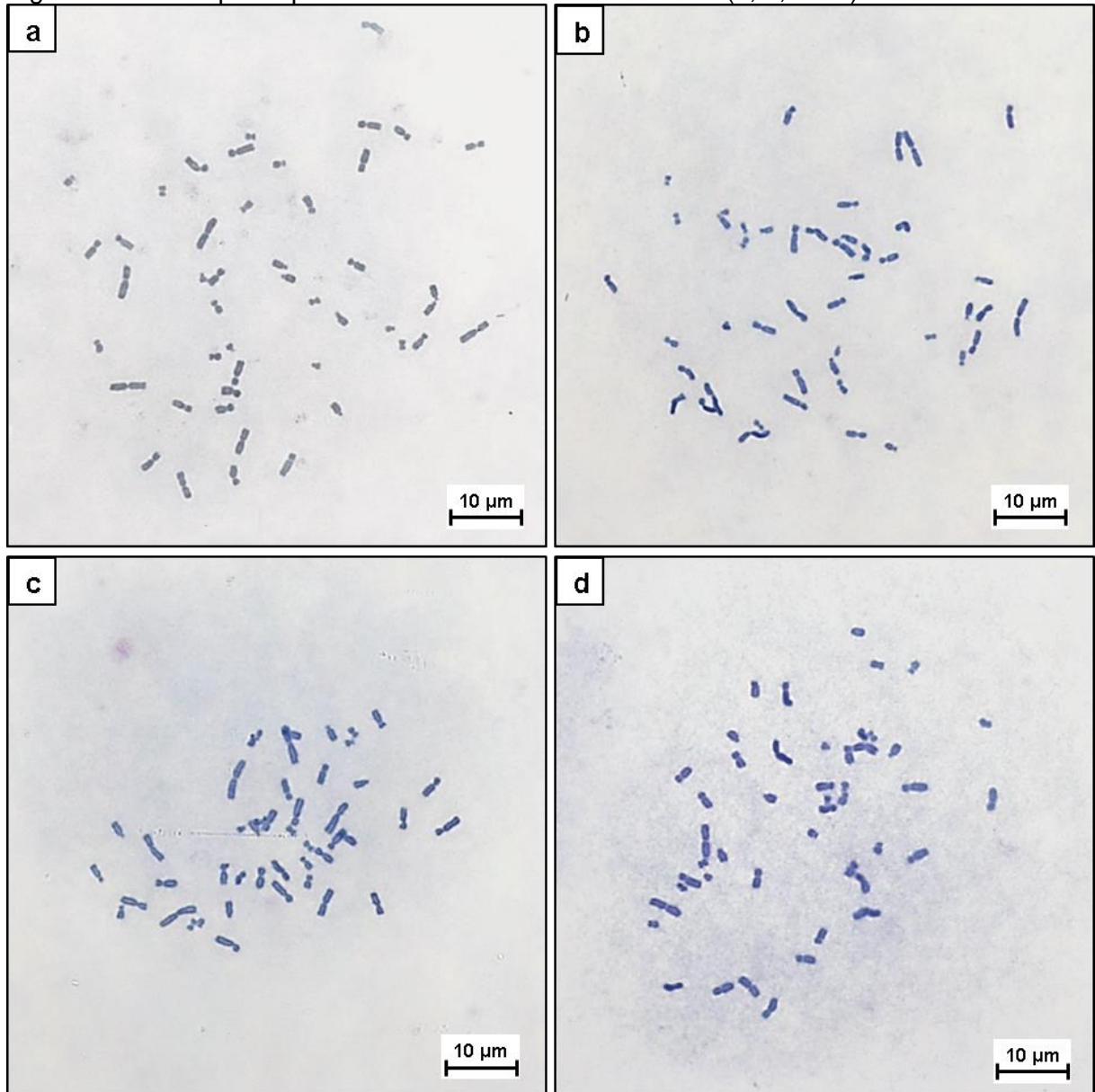
Nas Figuras 21a e 21c observa-se que o grupo controle não apresentou mudança no padrão de crescimento das células, que se espalharam por todo poço da placa, com formação de múltiplas camadas. Nas culturas com a presença do meio para diferenciação condrogênica (Figuras 21b e 21d), foi observada que a cultura de células apresentava-se como um agregado tridimensional.

5.2.4 Análise cariotípica

Os cariótipos celulares das células em cultura foram analisados em termos da estabilidade numérica. Os 30 cariótipos contados apresentaram um conjunto de 46

cromossomos. Na figura 22 estão apresentados quatro cariótipos utilizados para a contagem cromossômica das células em cultura.

Figura 22 - Cariótipos representativos das células em cultura (a, b, c e d).



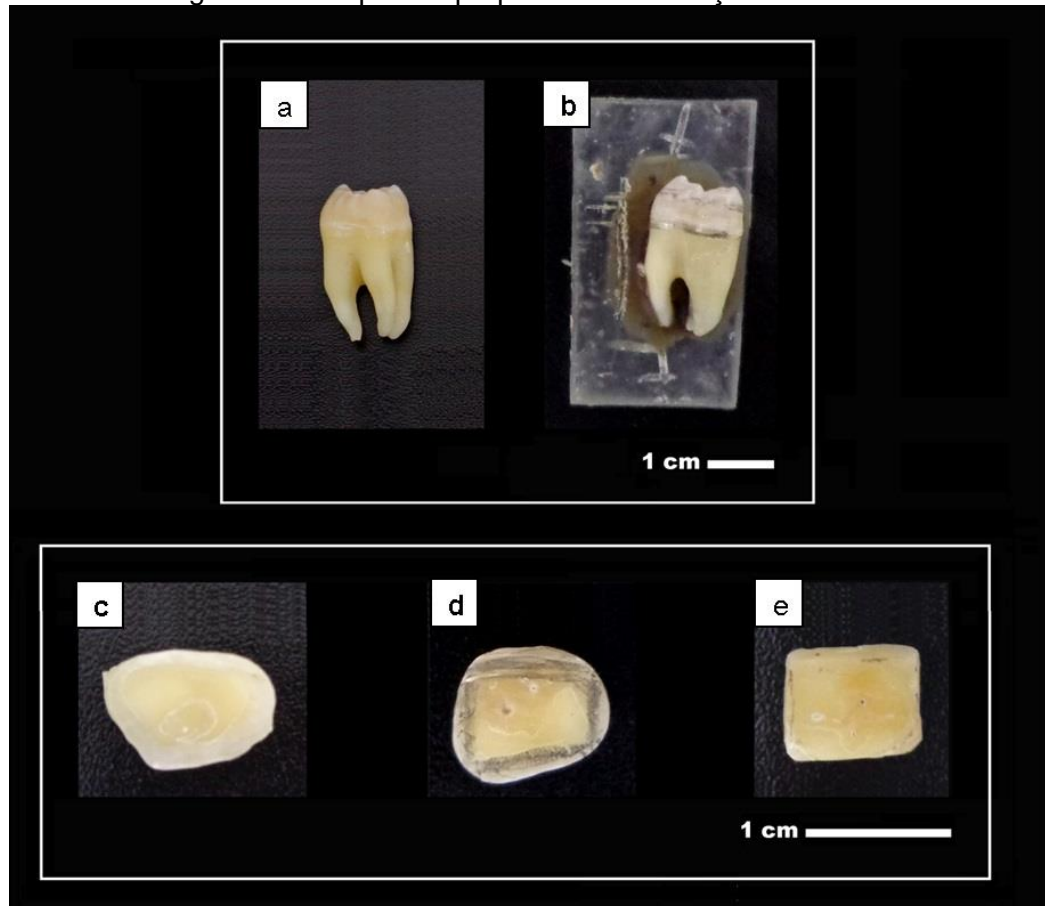
Fonte: Própria.

5.3 Preparo do arcabouço de dentina

Após a fixação nos suportes (Figura 23a) e corte dos dentes molares permanentes, nas regiões delimitadas com lápis (Figura 23b), foram obtidas as fatias dentárias, nas quais era possível observar as camadas de esmalte e dentina (Figura 23c). A camada de esmalte se encontrava na região externa dos dentes e exibia

uma coloração branca; já a camada de dentina, localizada internamente, apresentava uma coloração mais amarelada. Com a delimitação das áreas (Figura 23d), a camada de esmalte foi removida (Figura 23e).

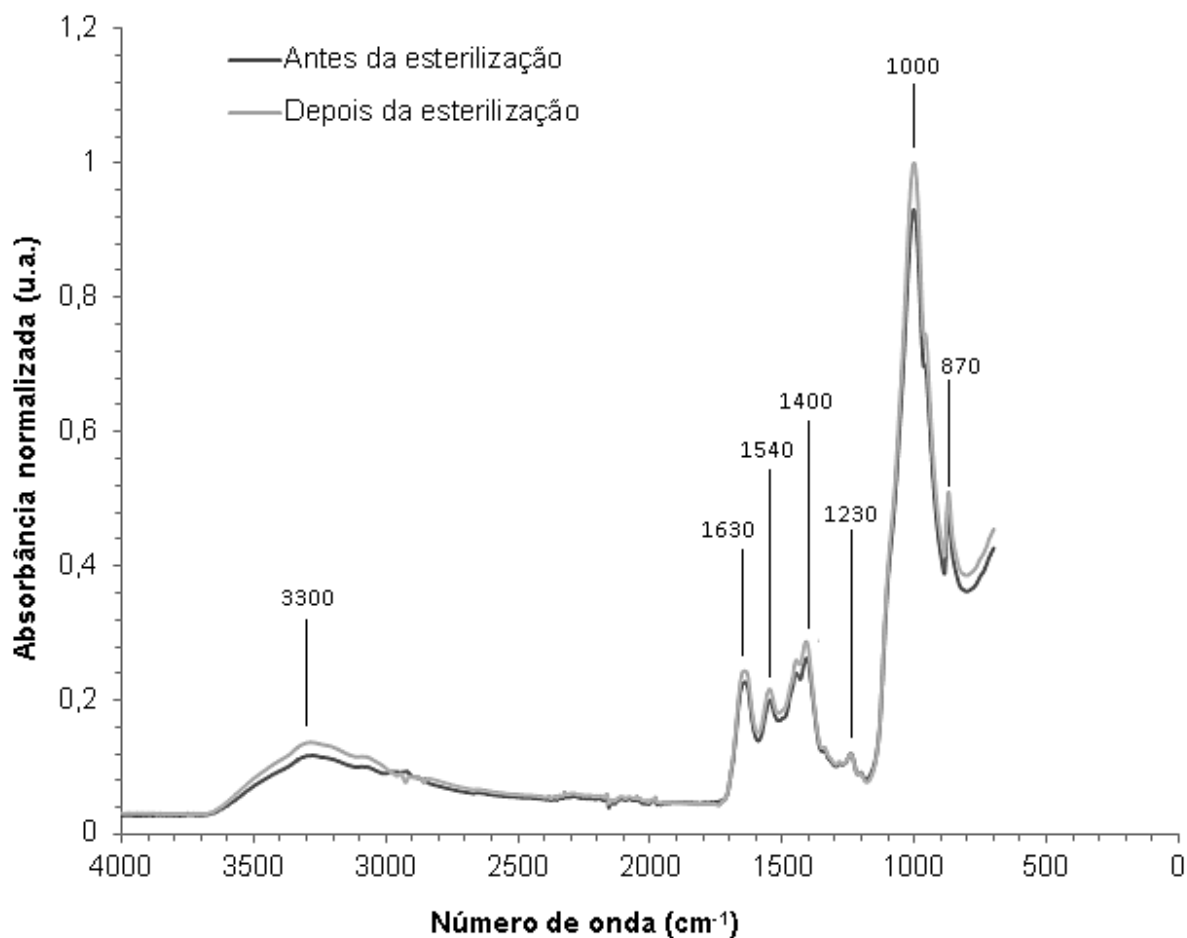
Figura 23 - Etapas do preparo do arcabouço de dentina.



Fonte: Própria.

A técnica de FTIR foi realizada para determinar os grupos funcionais da superfície das amostras de dentina e para avaliar o efeito da esterilização (radiação gama) sobre sua composição química. Os espectros com as bandas de absorção obtidas das amostras antes e depois da esterilização estão indicados no gráfico da Figura 24.

Figura 24 - Gráfico dos espectros médios de ATR/FTIR, na região compreendida entre 4000-700 cm^{-1} , das amostras de dentinas antes e depois da esterilização, com a identificação do número de onda dos principais grupos funcionais (n=8).



Fonte: Própria.

Na Tabela 1 estão apresentadas as bandas de absorção observadas nos arcabouços de dentina e os valores referência encontrados na literatura, associados aos diferentes modos de vibração das ligações dos principais grupos químicos que compõem a dentina.

Tabela 1 - Números de onda evidenciados nos espectros obtidos para as amostras de dentina através da análise de ATR/FTIR e suas interpretações e referências.

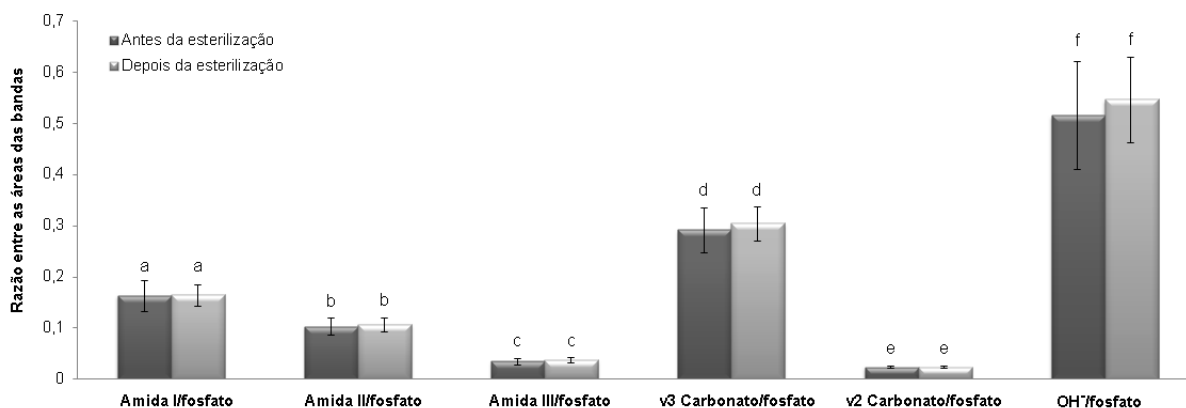
Número de onda referência (cm ⁻¹)	Interpretação	Número de onda obtido das amostras de dentina (cm ⁻¹)	Referências
3700–2700	Estiramento OH da água	3300	BACHMANN <i>et al.</i> , 2003 KIM <i>et al.</i> , 2010 TABATABAEI <i>et al.</i> , 2016b
1630	Estiramento C=O da amida I	1630	BACHMANN <i>et al.</i> , 2003 BOTTA <i>et al.</i> , 2012 LIU <i>et al.</i> , 2014
1551	Estiramento C–N e flexão N–H da amida II	1540	BACHMANN <i>et al.</i> , 2003 KIM <i>et al.</i> , 2010
1409	Estiramento assimétrico ν_3 do carbonato (CO ₃ ²⁻)	1400	BENETTI <i>et al.</i> , 2015
1240	Estiramento C-N e flexão N-H da amida III	1230	BOTTA <i>et al.</i> , 2012 BENETTI <i>et al.</i> , 2015
1130–1000	Estiramento assimétrico ν_3 do fosfato (PO ₄ ³⁻)	1000	BACHMANN <i>et al.</i> , 2003 KIM <i>et al.</i> , 2010
920–820	Deformação assimétrica ν_2 do carbonato (CO ₃ ²⁻)	870	LIU <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Própria.

A partir da análise dos espectros da Figura 24 e Tabela 1 é possível verificar que as bandas encontradas nas amostras são características dos grupos químicos da dentina encontradas na literatura. Após a esterilização não houve aparecimento ou eliminação de nenhuma das bandas típicas da dentina.

Na análise semi-quantitativa foram calculadas as áreas das bandas dos grupos químicos, sendo feita a normalização pela banda do ν_3 fosfato, conforme gráfico da Figura 25.

Figura 25 - Gráfico dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, ν_3 carbonato, ν_2 carbonato e OH^- , normalizados pela área da banda do fosfato, obtidos antes e depois da esterilização das amostras de dentina (n=8). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes dentro do mesmo componente químico, segundo o teste t de Student pareado. As barras evidenciam o desvio-padrão.



Fonte: Própria.

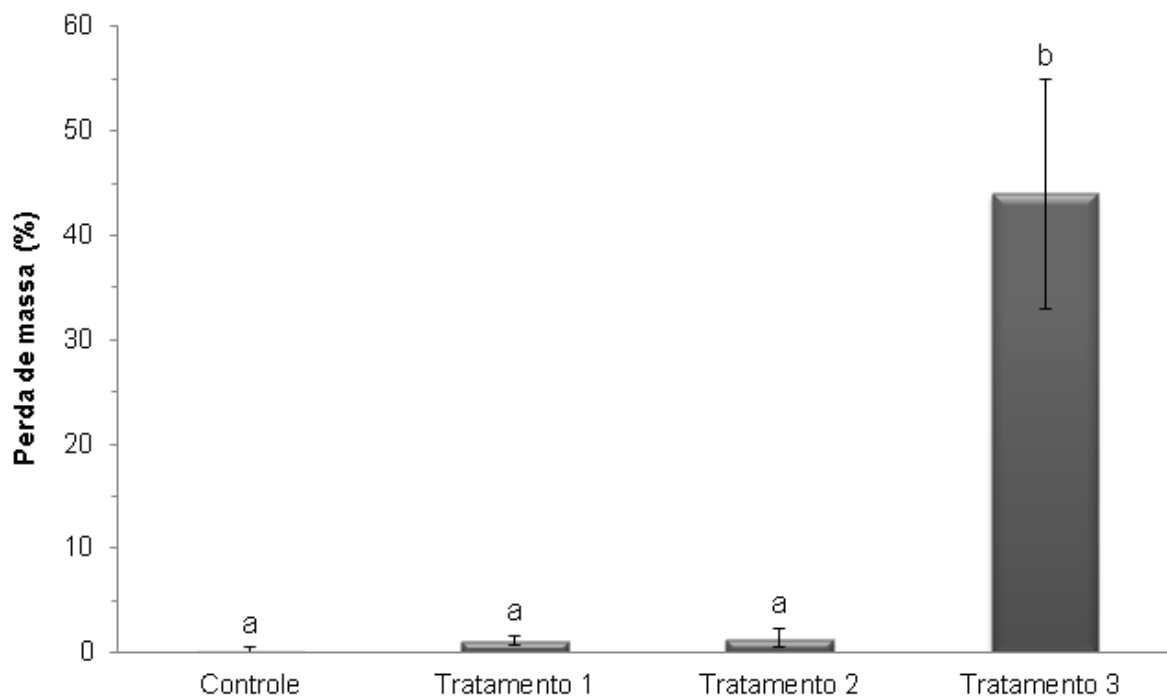
Segundo a análise estatística, utilizando o teste t de Student pareado, foi verificado que não houve alteração significativa, antes e após o procedimento de esterilização, entre as razões de fosfato para amida I (p-valor 0,824), amida II (p-valor 0,2087), amida III (p-valor 0,1887), ν_3 carbonato (p-valor 0,2867) ν_2 carbonato (p-valor 0,5347) e OH^- (p-valor 0,3365). Portanto, a esterilização dos arcações por radiação gama não interfere na composição deles.

5.4 Caracterização do arcação de dentina

5.4.1 Avaliação da perda de massa

Na Figura 26 estão apresentadas as médias das porcentagens de perda de massa das amostras de dentina, antes e após os tratamentos para desmineralização.

Figura 26 – Gráfico das médias das porcentagens de perda de massa das amostras de dentina (n=5). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes em comparação com o controle, segundo o teste Dunn. As barras evidenciam desvio-padrão.



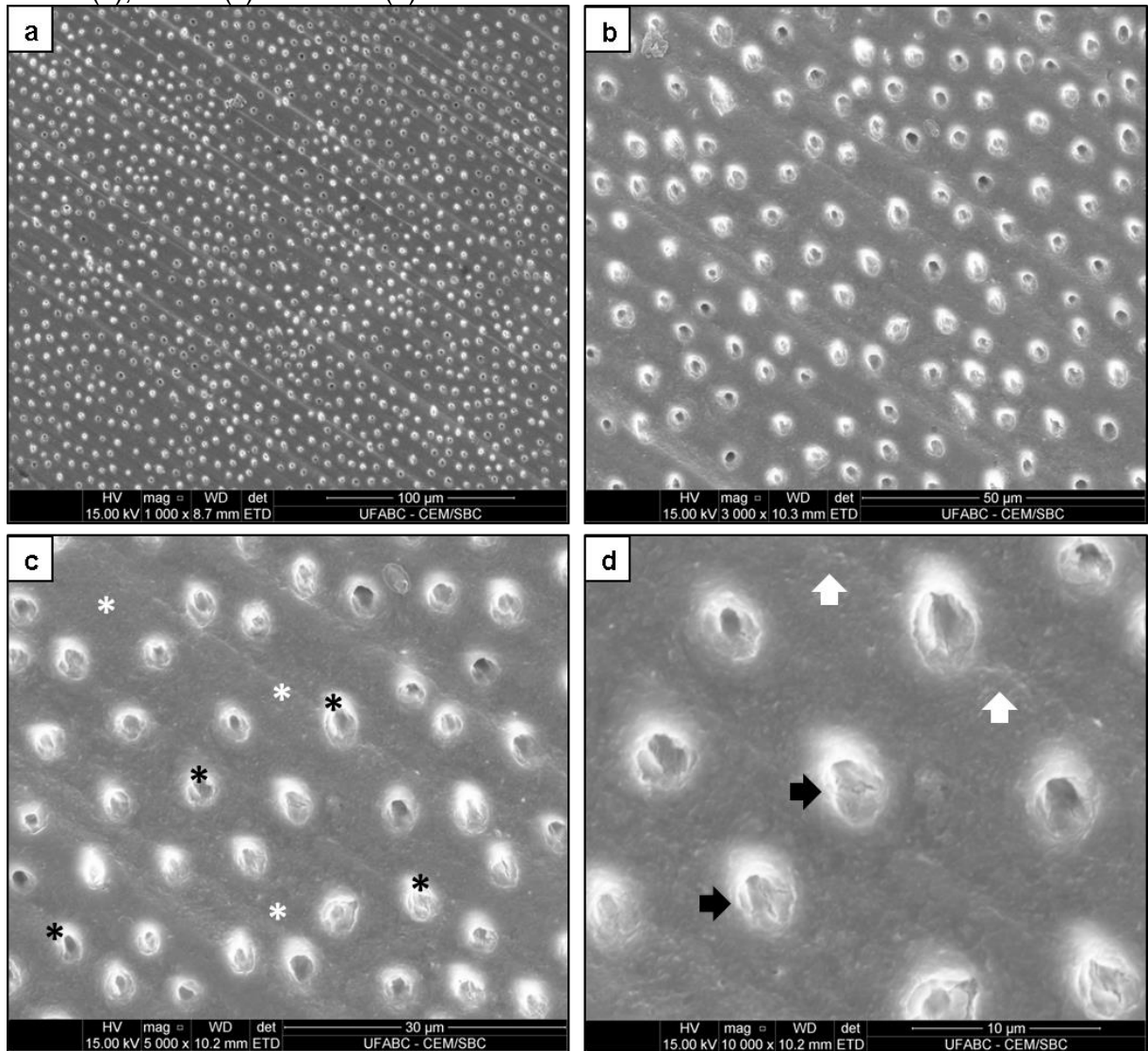
Fonte: Própria.

Com a realização do teste Kruskal-Wallis e o pós-teste Dunn, foi possível verificar que apenas o tratamento 3 (40% de perda de massa) apresentou uma perda de massa estatisticamente diferente do controle (p-valor 0,0009). Os grupos tratamentos 1 (1% de perda de massa) e 2 (1% de perda de massa) não exibiram diferença significativa em relação ao grupo controle (p-valor 0,4668 e 0,6532, respectivamente).

5.4.2 Análise da estrutura

A análise por MEV das amostras de dentina permitiu observar que o grupo controle exibiu os túbulos dentinários parcialmente obstruídos e resíduos (*debris*) na superfície das amostras (Figura 27), assim como riscos decorrentes do processo de corte das mesmas. É possível verificar as dentinas peritubular e intertubular (Figura 27c).

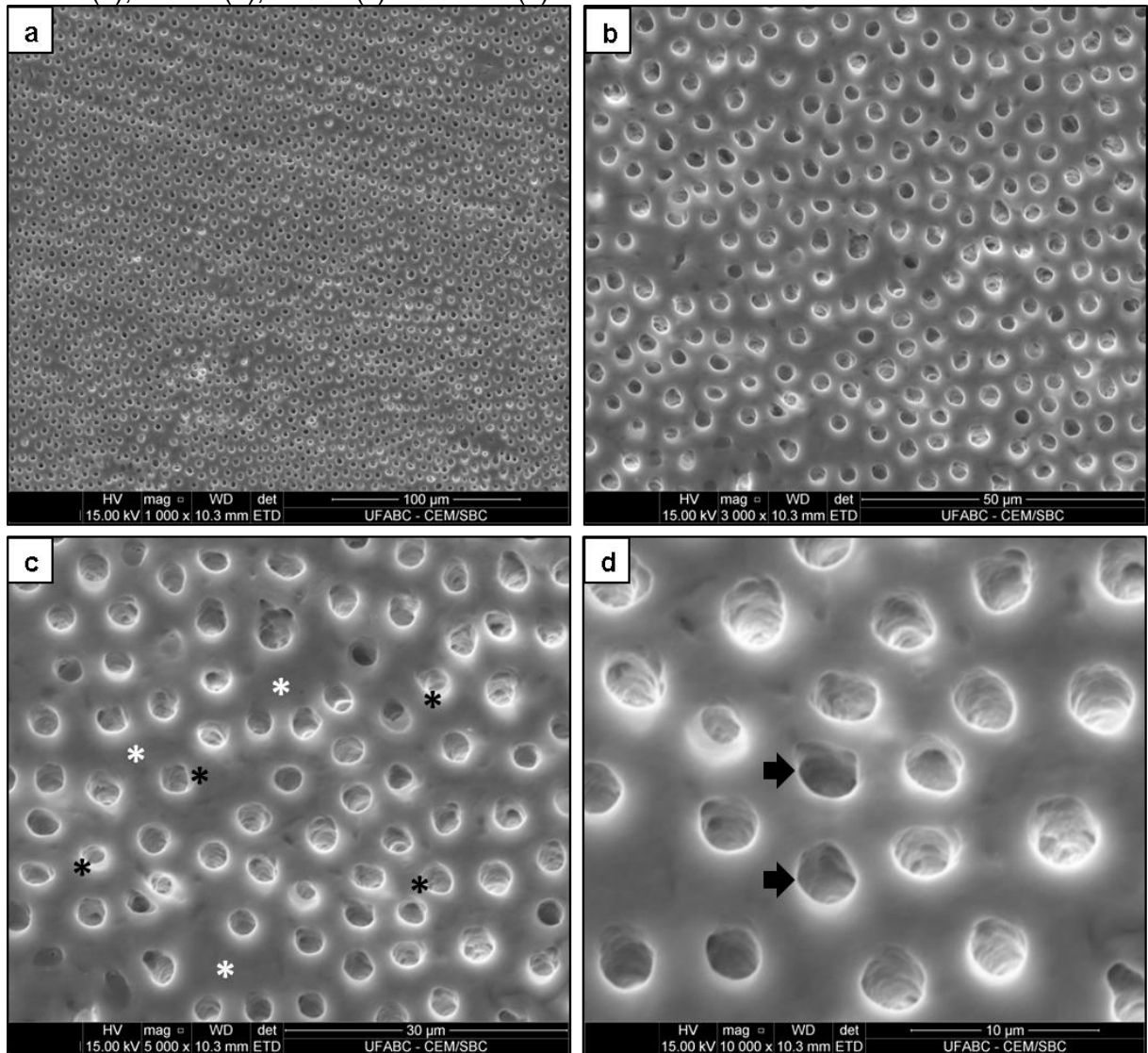
Figura 27 – Dentina sem tratamento (controle), observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas brancas evidenciam resíduos depositados na superfície da dentina e as pretas os túbulos parcialmente obstruídos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).



Fonte: Própria.

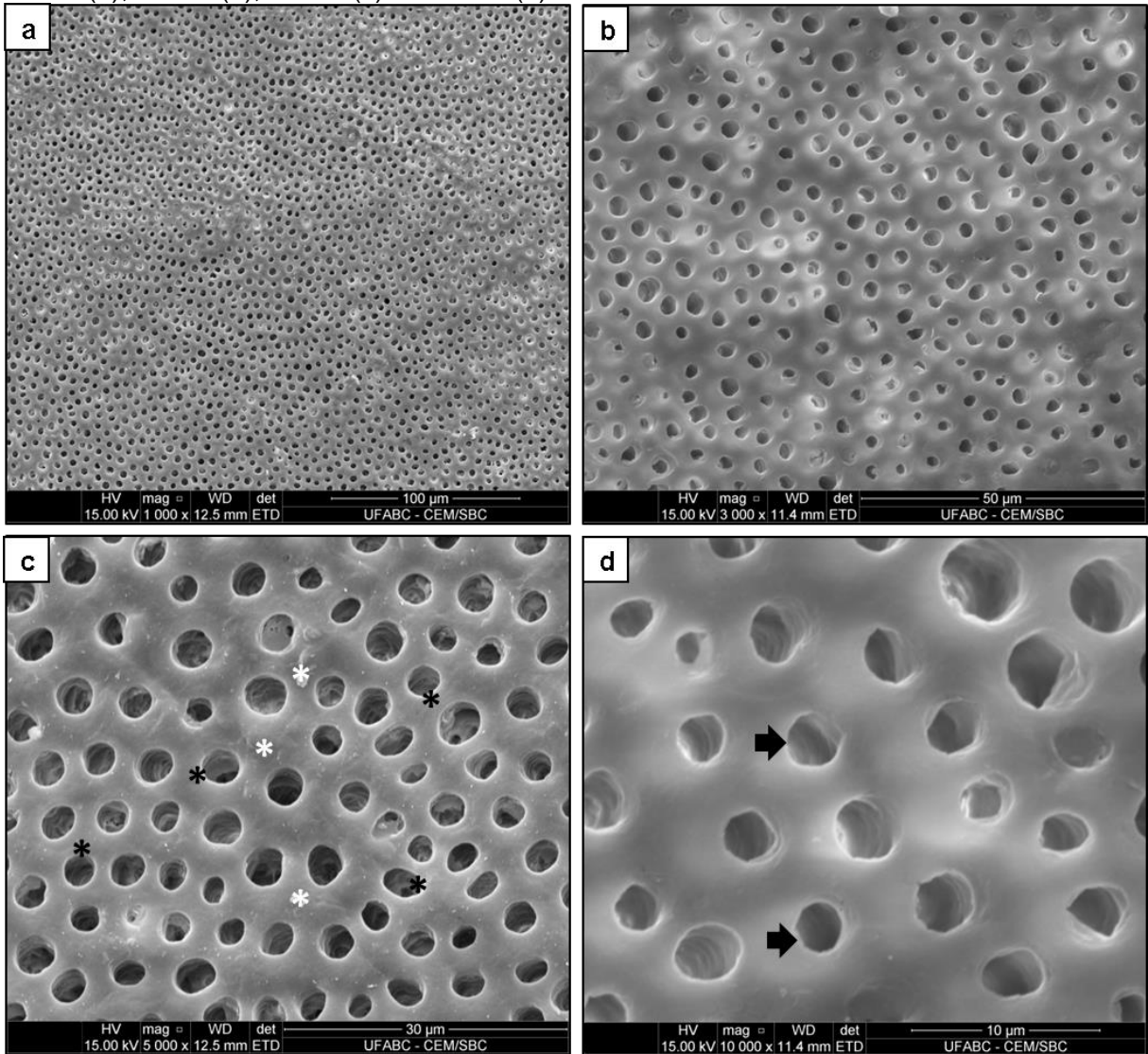
Nos tratamentos 1 (Figura 28), 2 (Figura 29) e 3 (Figura 30), foi averiguado que os túbulos estavam totalmente abertos e a superfície das amostras não apresentava deposição de *debris*.

Figura 28 – Dentina após tratamento 1, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).



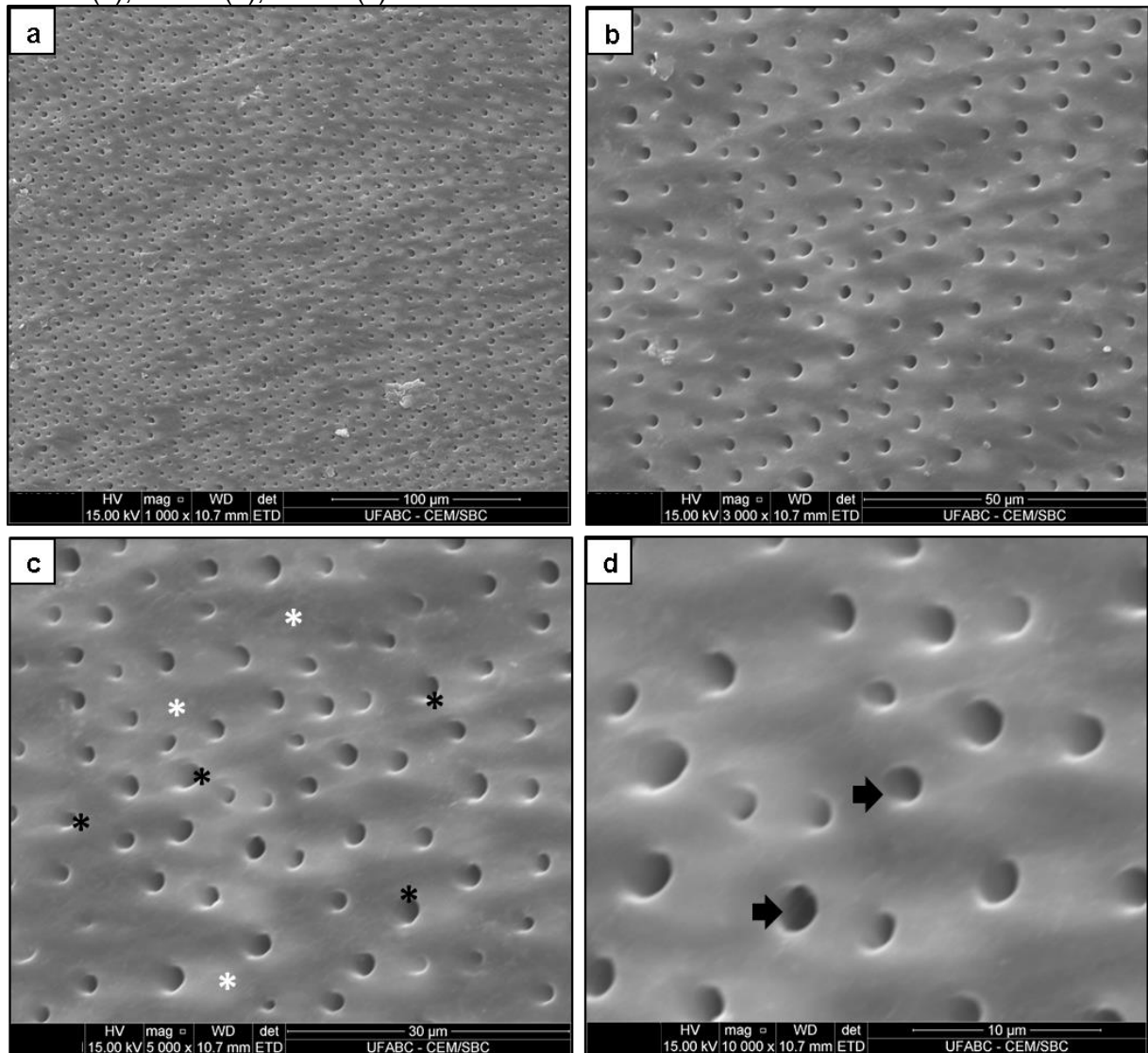
Fonte: Própria.

Figura 29 – Dentina após tratamento 2, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x (d).



Fonte: Própria.

Figura 30 – Dentina tratamento 3, observada por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos destacam as áreas de dentina peritubular e os brancos a dentina intertubular (c). As setas pretas evidenciam os túbulos abertos (d). Magnificação original: 1000x (a), 3000x (b), 5000x (c) e 10000x.

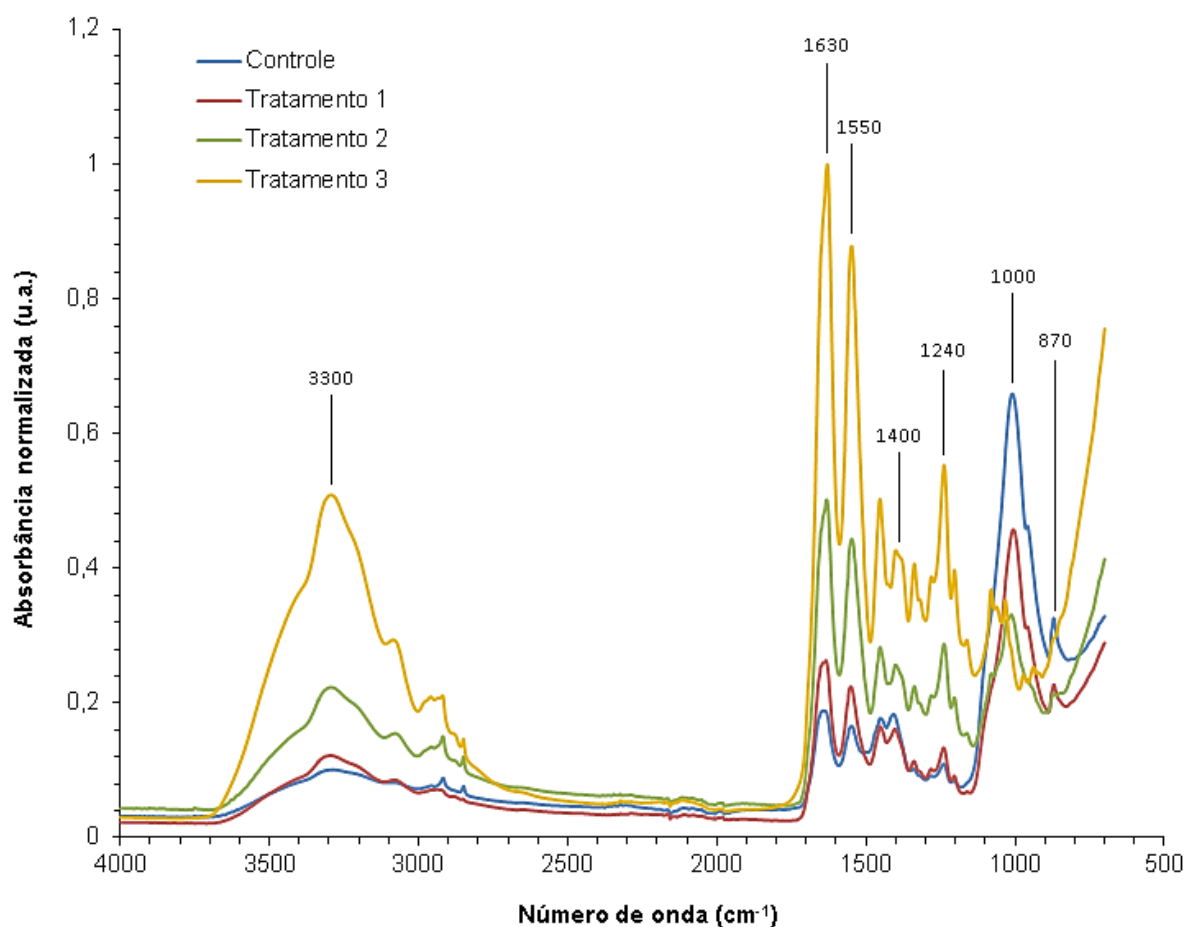


Fonte: Própria.

5.4.3 Avaliação por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros médios com as bandas de absorção dos quatro grupos experimentais da dentina estão mostrados no gráfico da Figura 31.

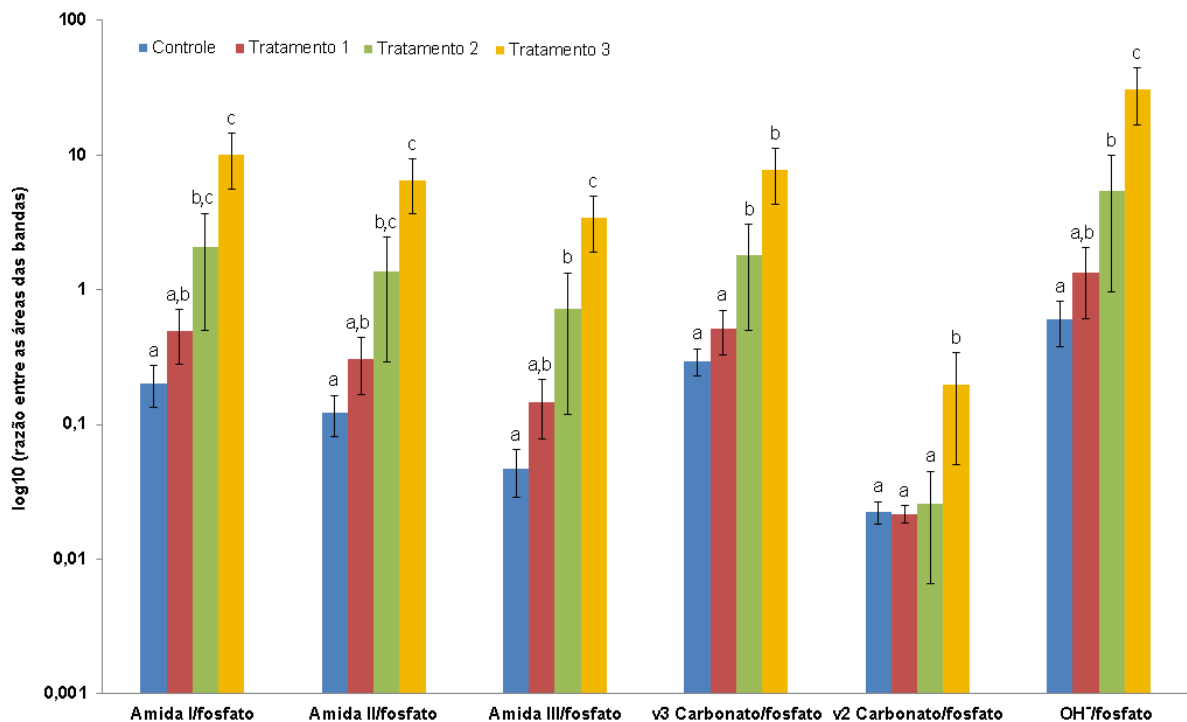
Figura 31 - Gráfico dos espectros médios de ATR/FTIR, na região compreendida entre 4000-700 cm^{-1} , das amostras de dentina testadas, com a identificação do número de onda dos principais grupos funcionais (n=19).



Os espectros da Figura 30 demonstram que os quatro grupos experimentais apresentam as bandas de absorção características dos principais grupos químicos da dentina, conforme descrito na Tabela 1. É possível notar que os tratamentos causaram modificações na dentina, com redução da intensidade da banda correspondente ao modo de vibração ν_3 do fosfato, além de redução da intensidade da banda correspondente à deformação antissimétrica ν_2 do carbonato (870 cm^{-1}), o que sugere que houve perda de mineral das amostras. Houve aumento aparente das intensidades das bandas correspondentes à matriz orgânica da dentina (amidas I, II e III) e também de OH^- para os tratamentos 2 e 3, o que sugere maior exposição de colágeno e, conseqüentemente, da matriz orgânica da dentina em função da perda de mineral, assim como o aumento do teor de água das amostras. Não houve o surgimento ou aparecimento de bandas de vibração; contudo, o tratamento 3

promoveu alteração das intensidades das bandas de fosfato de forma mais significativa e, adicionalmente, o deslocamento da banda de ν_3 fosfato (de 1000 para 1100 cm^{-1}), o que indica não apenas remoção mas modificação dos grupamentos vizinhos (ligados) como também alteração do modo de vibração do fosfato remanescente (alteração de vibração de estiramento antissimétrico para vibração de estiramento simétrico). A análise semi-quantitativa é expressa pelas razões entre as áreas das bandas de absorção dos espectros das dentinas, que estão apresentadas na Figura 32.

Figura 32 - Gráfico dos valores de razão das áreas das bandas de amida I, amida II, amida III, ν_3 carbonato, ν_2 carbonato e OH^- , normalizados pela área da banda do fosfato, obtidos das amostras de dentina testadas (n=19). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes dentro do mesmo componente químico, segundo o teste Dunn.



Fonte: Própria.

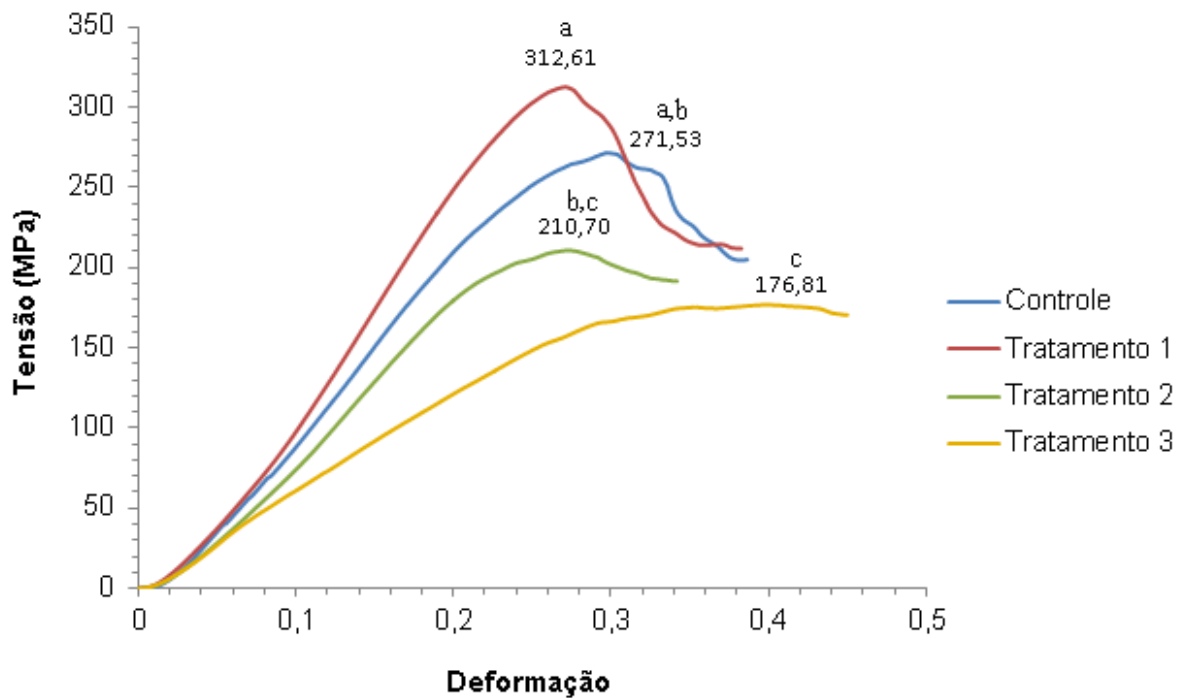
Para análise das proporções dos componentes químicos das dentinas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste Dunn. Como demonstrado na Figura 32, as razões de amida I/fosfato, amida II/fosfato, amida III/fosfato, ν_3 carbonato/fosfato e OH^- /fosfato não apresentam diferenças estatísticas entre o controle e o tratamento 1 ($p > 0,05$), mas nos tratamentos 2 e 3 esta proporção é significativamente maior em relação ao controle ($p < 0,0001$). A razão de ν_2

carbonato/fosfato é significativamente maior no tratamento 3 em relação ao controle ($p < 0,0001$), mas não apresenta diferença estatística entre os grupos tratamentos 1 e 2 ao controle ($p > 0,9999$).

5.4.4 Avaliação da resistência à compressão

Os dados do ensaio de compressão das amostras de dentina foram utilizados para gerar as curvas médias da tensão por deformação para cada tratamento (Figura 33).

Figura 33 - Gráfico da tensão pela deformação das amostras de dentina ($n=2$), pelo ensaio de compressão. Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes para os valores de limite de resistência à compressão, segundo o teste de Tukey.



Fonte: Própria.

No ensaio, a carga foi aplicada sobre as amostras de dentina dos quatro grupos até o ponto de fratura, sendo indicada a tensão máxima suportada por cada grupo no gráfico da Figura 33. Para análise estatística, foi realizado o teste ANOVA e o pós-teste Tukey, supondo a normalidade da distribuição e a igualdade das variâncias de acordo com os testes de Levene e Shapiro-Wilk.

As dentinas do grupo tratamento 1 e 2 não diferenciaram estatisticamente do controle (p-valor 0,2954 e 0,1143, respectivamente) quanto aos valores de tensão máxima (apresentados no gráfico da Figura 33). Ainda, ao observar o comportamento das curvas apresentadas pelos grupos controle e tratamento 1, é possível sugerir que os valores de tensão de ruptura e deformação total foram praticamente iguais nestes dois grupos experimentais. Entretanto, as amostras de dentinas do grupo tratamento 3 exibiram valores de tensão máxima significativamente menores que o controle (p-valor 0,0286). Foram observados resultados semelhantes para os valores de deformação no momento da fratura, os tratamentos 1 e 2 foram estatisticamente similares ao controle (p-valor 0,4381 e 0,4523, respectivamente) e o tratamento 3 foi significativamente maior (p-valor 0,0093).

5.4.5 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo teste do extrato, no qual as dentinas testadas foram colocadas em meio de cultura (α -MEM), que apresenta, como indicador de pH, o vermelho de fenol. As dentinas imersas no meio de cultura permaneceram na estufa a 37 °C, durante 24 horas (Figura 34).

Figura 34 – Amostras de dentina imersas em meio de cultura e mantidas na estufa a 37 °C, durante 24 horas.

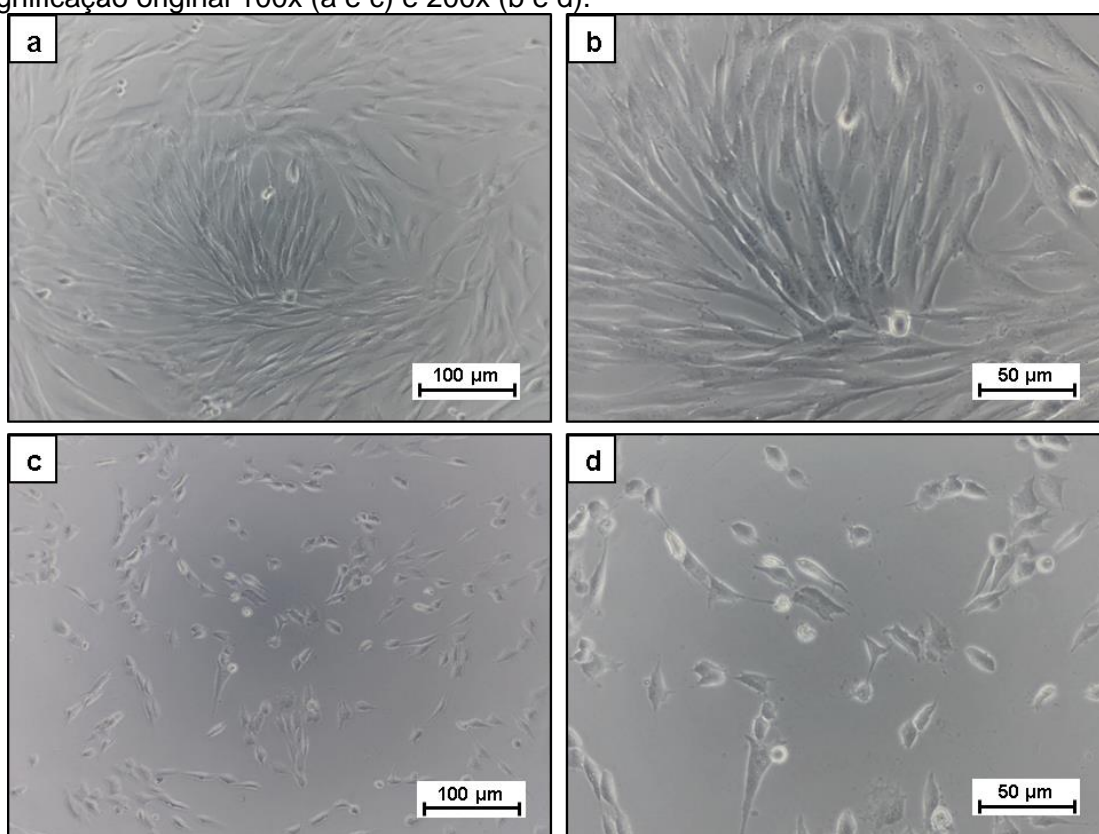


Fonte: Própria.

Na figura 34 é possível observar que o meio de cultura contendo as amostras do tratamento 3 apresentou uma coloração amarelada, enquanto os meios de cultura com as demais dentinas testadas tinham uma coloração vermelha-clara.

Na análise morfológica do teste de citotoxicidade, foram observadas que as células do controle negativo (não citotóxico) apresentavam morfologia típica, não havendo sinais de degeneração celular. No controle positivo (citotóxico), as células não exibiam sua morfologia alongada característica, estando retraídas e tornando-se arredondadas, como um padrão típico de citotoxicidade (Figura 35).

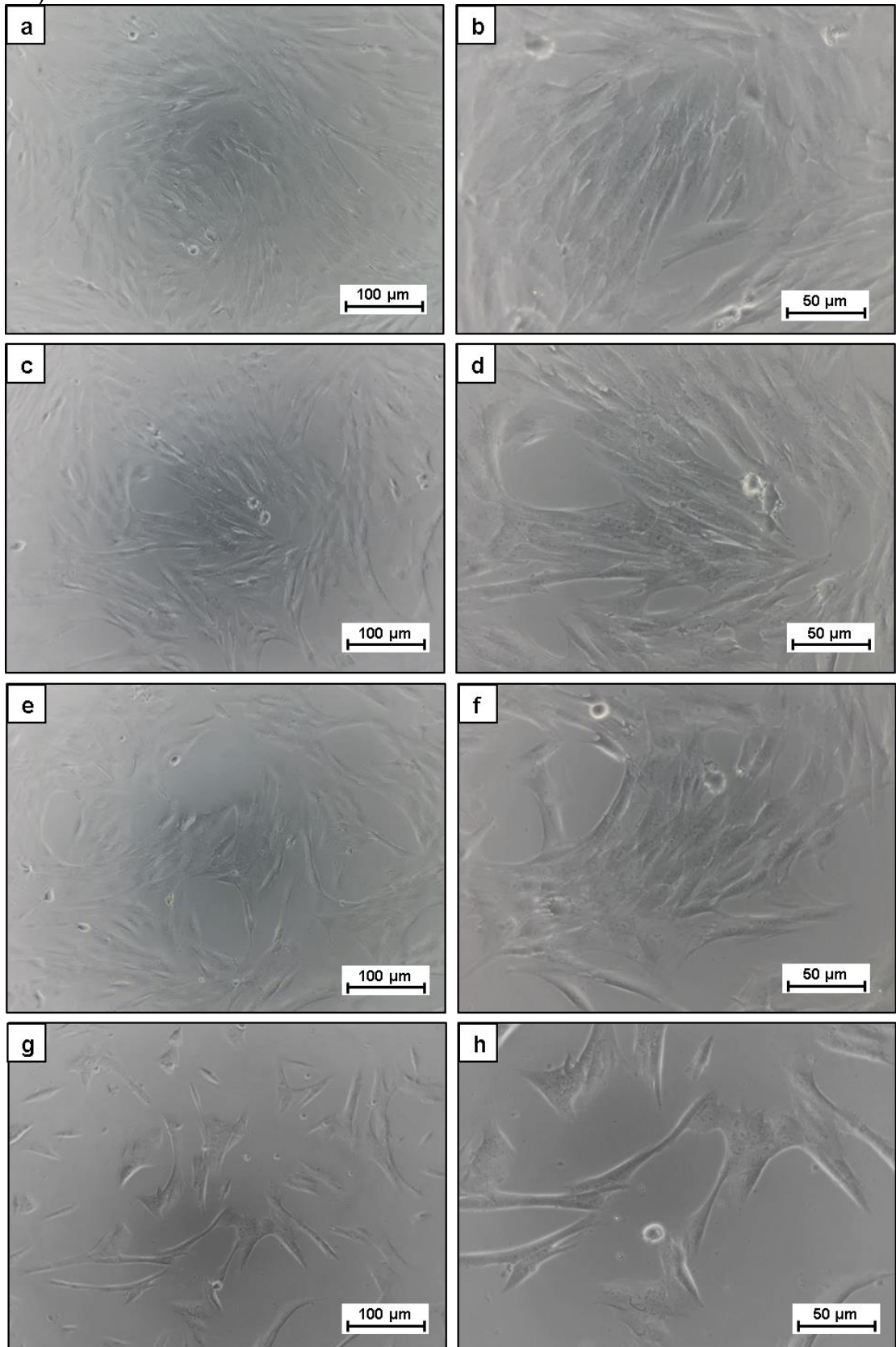
Figura 35 - Teste de citotoxicidade. Controle negativo (placa de cultura, a e b) e controle positivo (fenol 0,25%, c e d). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Magnificação original 100x (a e c) e 200x (b e d).



Fonte: Própria.

As células cultivadas na presença dos extratos das dentinas sem tratamento (controle) e após os tratamentos 1 e 2 estavam aderidas à placa, exibindo morfologia alongada, com padrão de crescimento similar ao controle negativo (Figuras 36a, b, c, d e f). No entanto, as culturas mantidas com o extrato da dentina após tratamento 3 apresentaram uma diminuição da confluência.

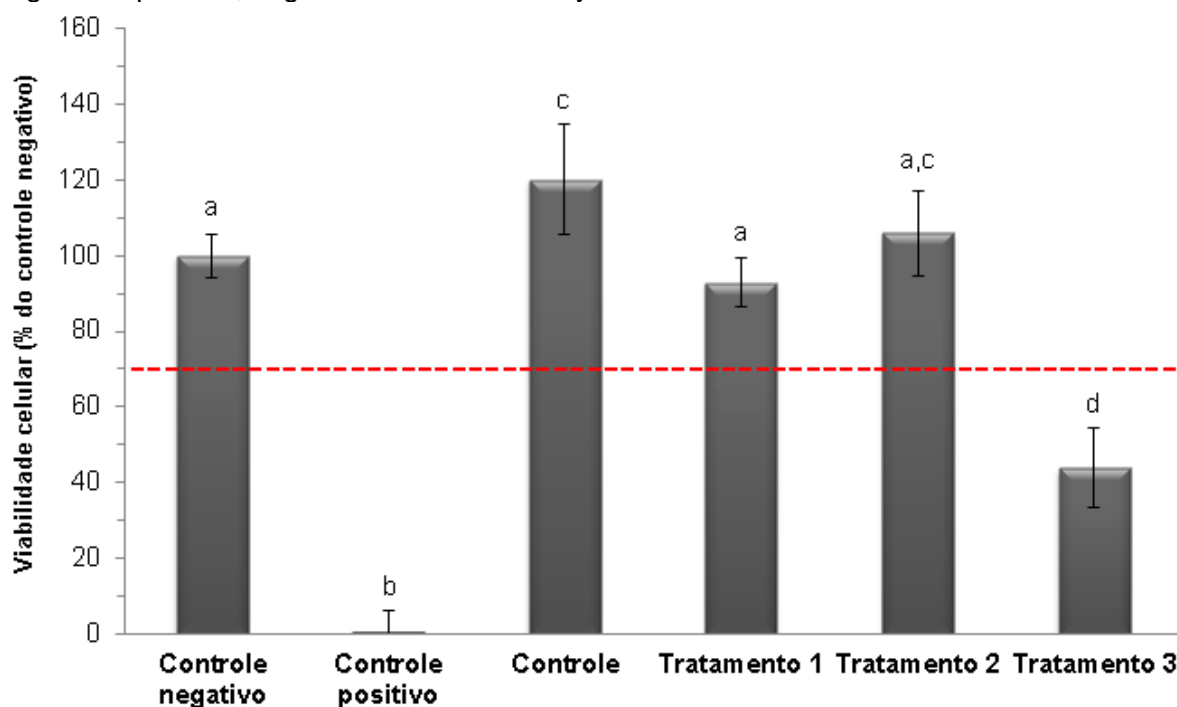
Figura 36 - Teste de citotoxicidade. Cultura com extrato das dentinas sem tratamento (a e b), tratamento 1 (c e d), tratamento 2 (e e f) e tratamento 3 (g e h). Observação por microscopia de luz, com contraste de fase. Magnificação original 100x (a, c, e e g) e 200x (b, d, f e h).



Fonte: Própria.

O resultado da quantificação do teste de citotoxicidade, pelo ensaio do MTT, segue descrito na Figura 37.

Figura 37 - Gráfico das médias de viabilidade celular do controle negativo, controle positivo (fenol 0,25%) e das culturas com os extratos das dentinas testadas (n=5). A linha pontilhada vermelha demarca o valor de viabilidade de 70% do controle negativo. Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes em comparação com os controles negativo e positivo, segundo o teste de Tukey.



Fonte: Própria.

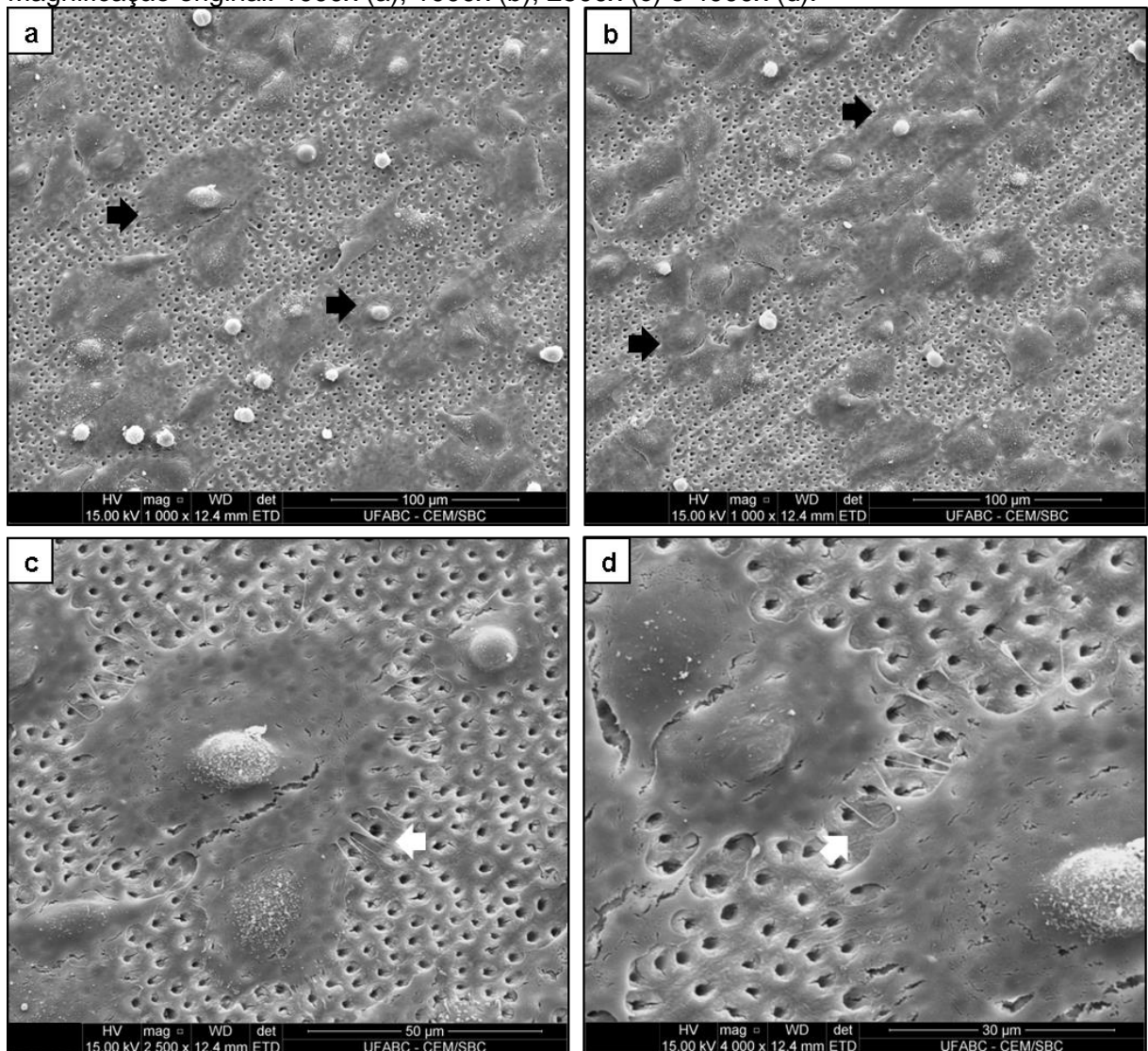
A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey, supondo a normalidade da distribuição e a igualdade das variâncias. O controle positivo (fenol) e o extrato da dentina após o tratamento 3 apresentaram valores de viabilidade inferiores a 50% do controle negativo (placa de cultura). Os extratos das dentinas dos grupos controle e após tratamento 1 e 2 exibiram valores de viabilidade superiores a 90% em relação ao controle negativo.

5.5 Análise da interação entre as células-tronco e a dentina

Para verificação da interação das células com os arcabouços de dentina, as culturas foram analisadas por MEV (Figuras 38 a 49).

As células inoculadas na dentina controle, com um período de duas horas, mostravam-se distribuídas por todo o arcabouço (Figura 38a e b). Algumas células ainda apresentavam morfologia arredondada, porém a maioria já iniciava o processo de espalhamento, sendo possível a observação dos filopódios e lamelipódios (Figura 38c e d).

Figura 38 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a e b). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2500x (c) e 4000x (d).

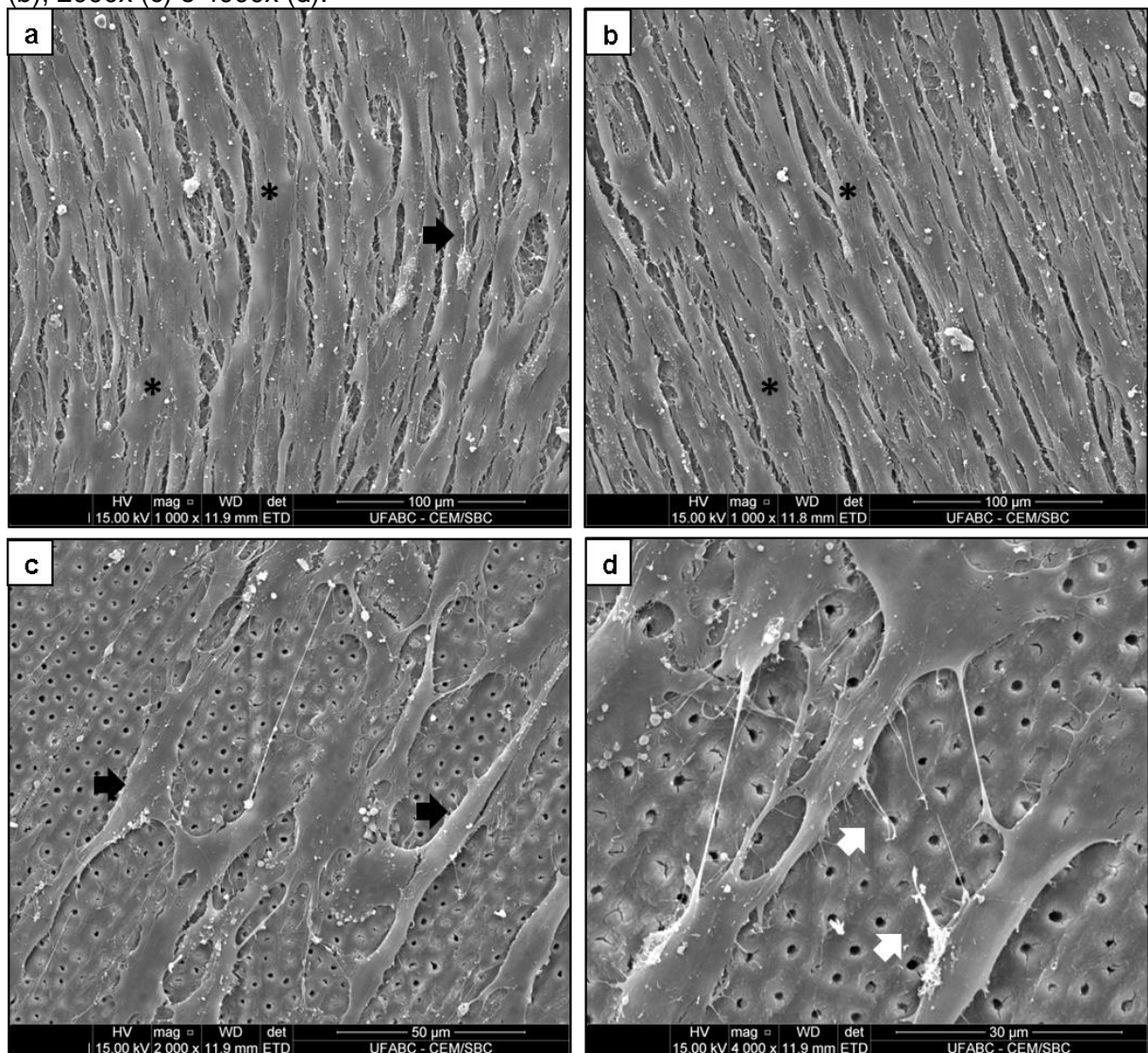


Fonte: Própria.

Com três dias de cultura, foi observada uma grande quantidade de células, formando uma monocamada confluyente em grande parte do arcabouço controle (Figura 39a e b). As células exibiam morfologia alongada e longos processos

citoplasmáticos (Figura 39c e d). Foi possível observar que a superfície celular exibia irregularidades (Figura 39c e d), como pequenas vesículas e foram verificadas também células em divisão (Figura 39a).

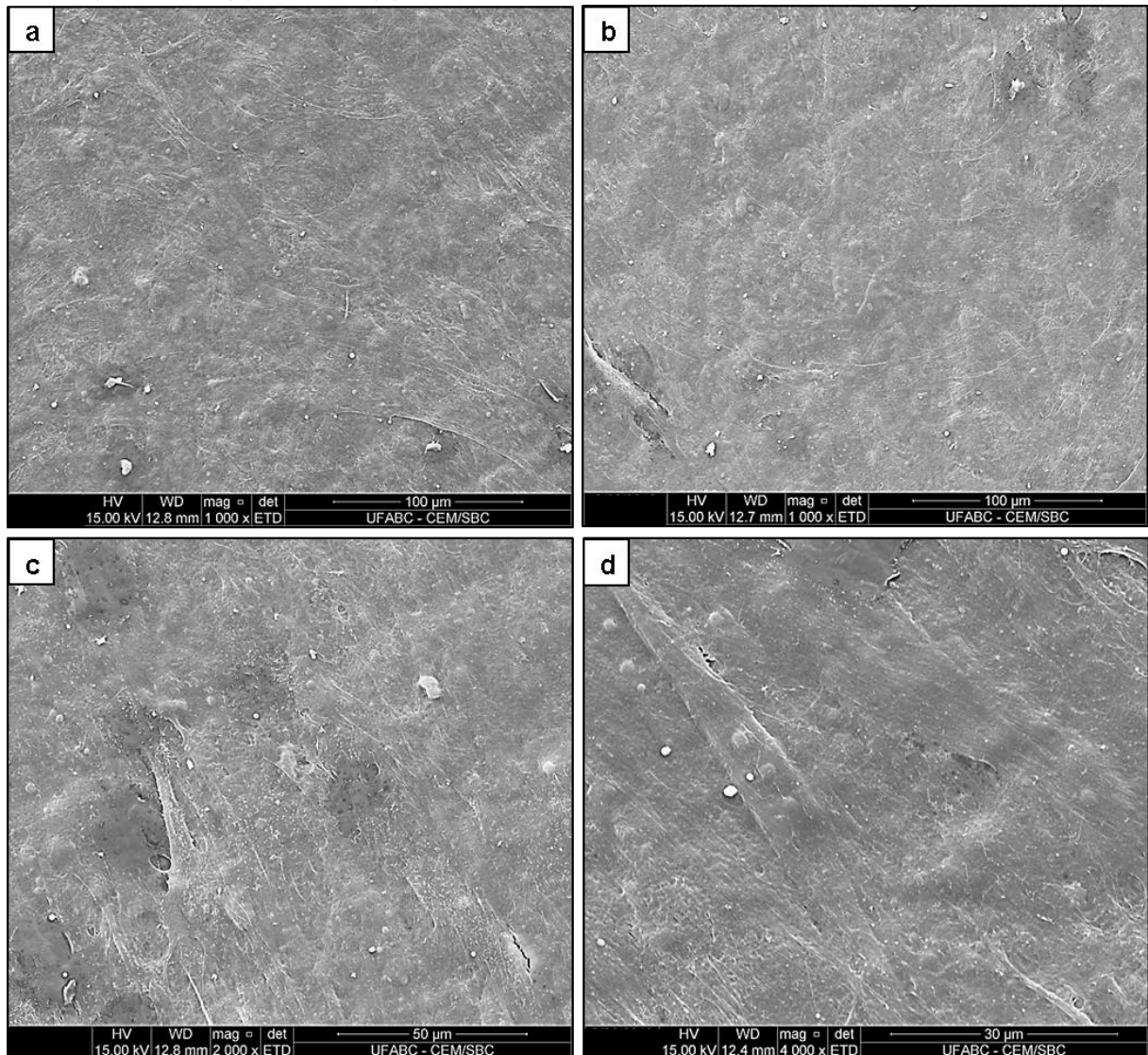
Figura 39 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células (a e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

As culturas mantidas por 21 dias apresentavam crescimento em multicamada, sendo difícil a observação dos limites células, assim como dos túbulos dentinários (Figura 40a).

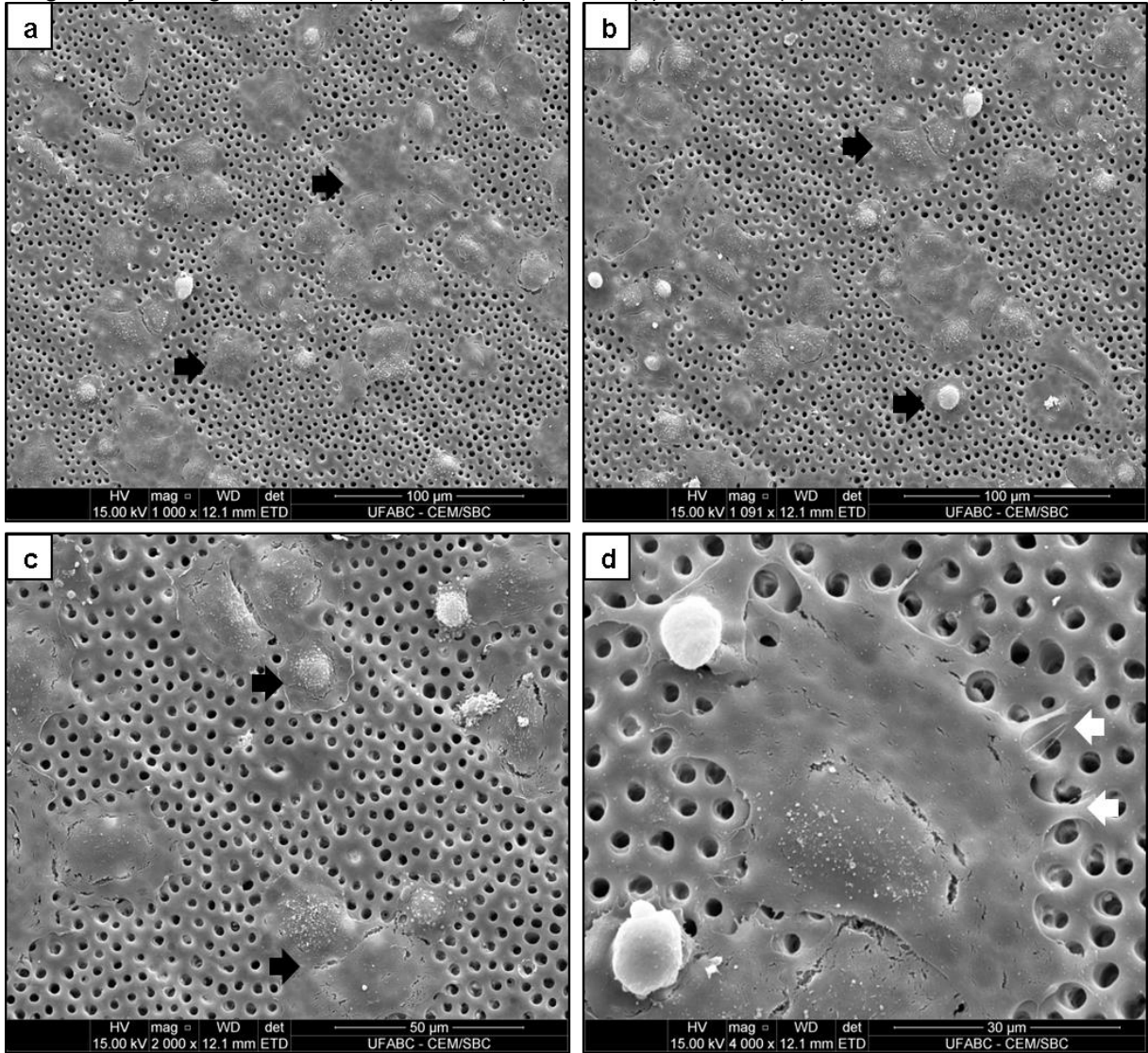
Figura 40 - Células sobre a dentina sem tratamento (controle), com 21 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

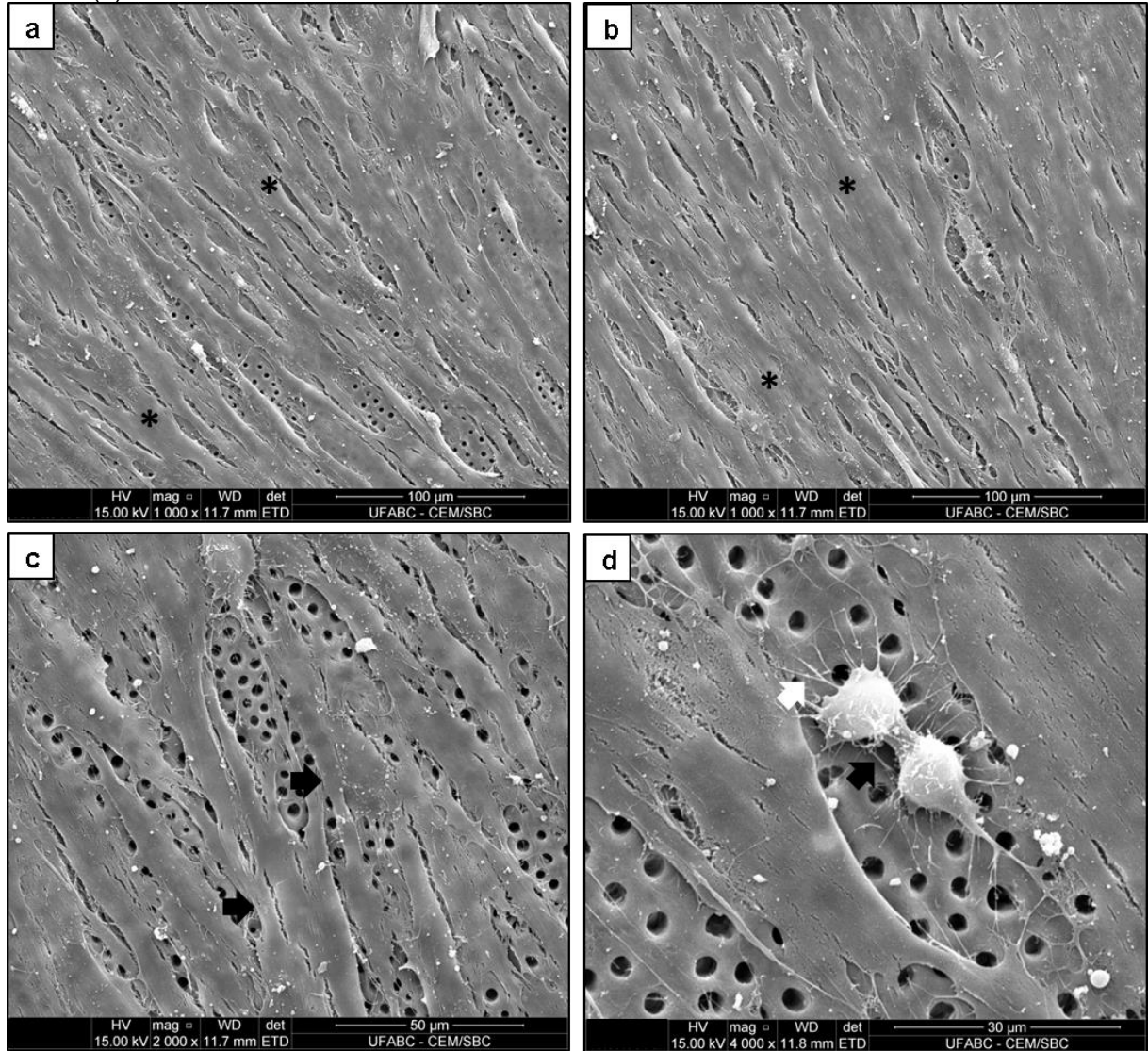
As culturas de células inoculadas sobre a dentina tratamento 1 (Figuras 41, 42 e 43) e tratamento 2 (Figuras 44, 45 3 46) apresentaram um padrão de crescimento e de morfologia similares com os da cultura controle, para os períodos analisados.

Figura 41 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1091x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



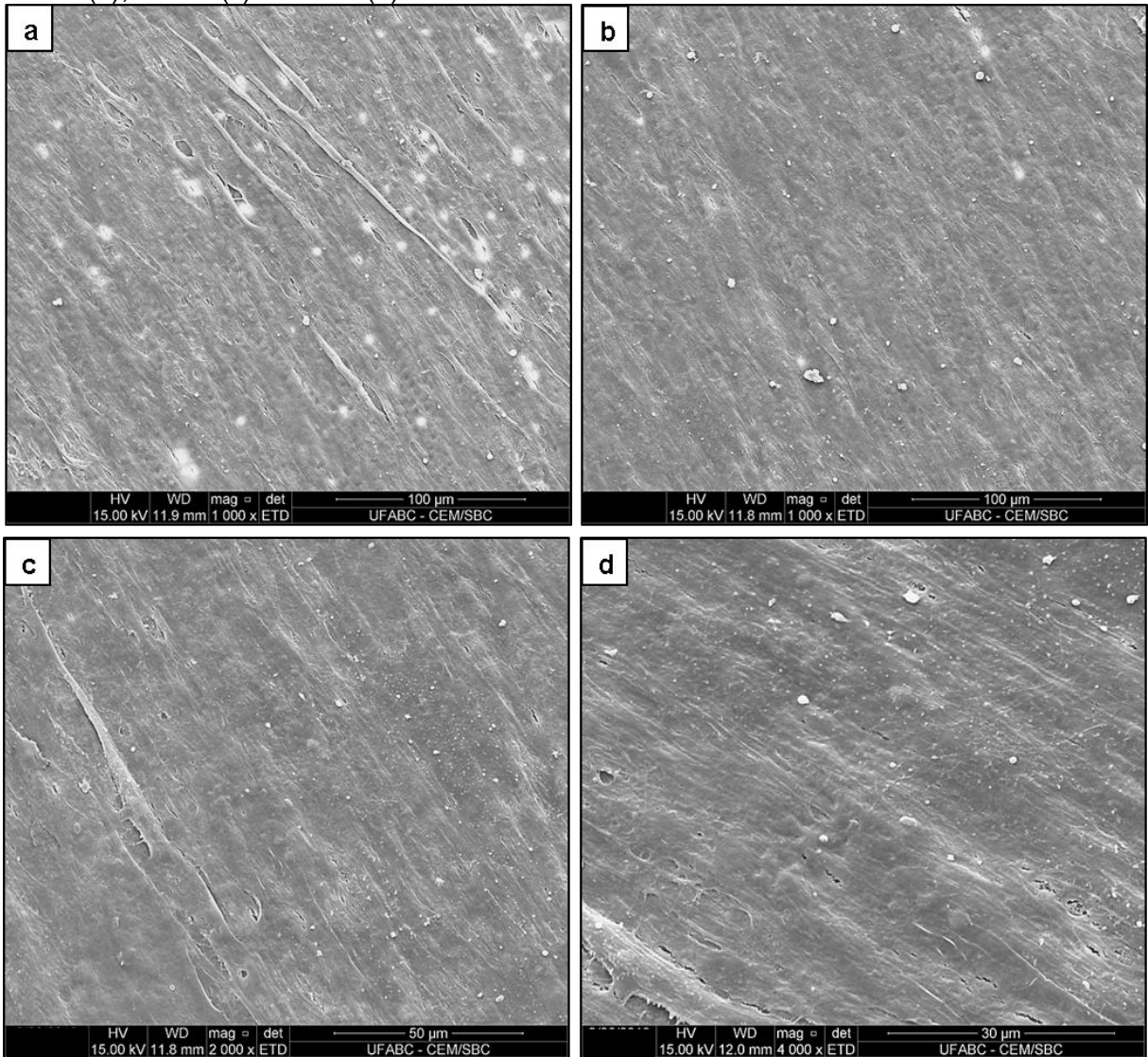
Fonte: Própria.

Figura 42 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células e as setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



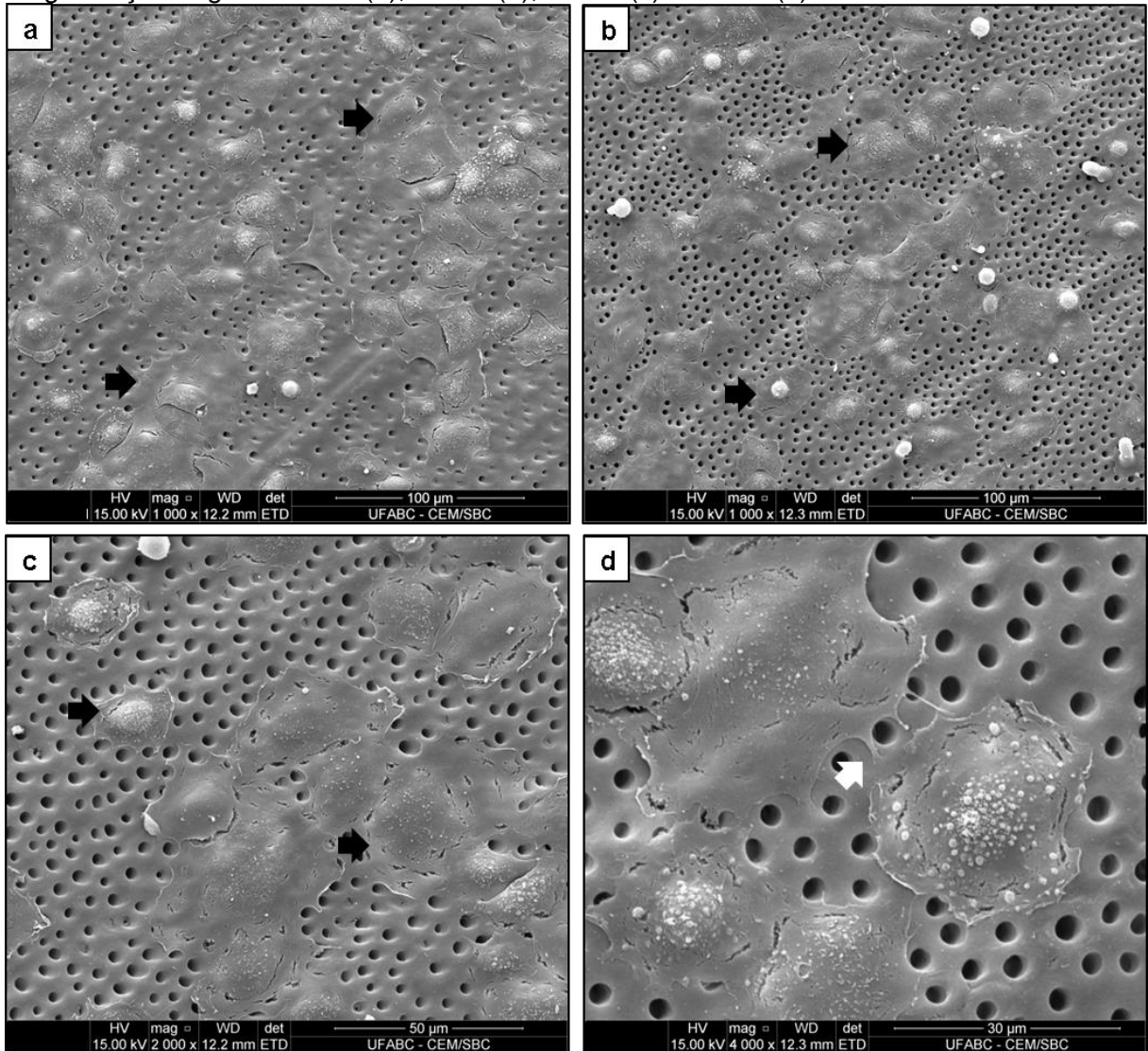
Fonte: Própria.

Figura 43 - Células sobre a dentina após o tratamento 1, com 21 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



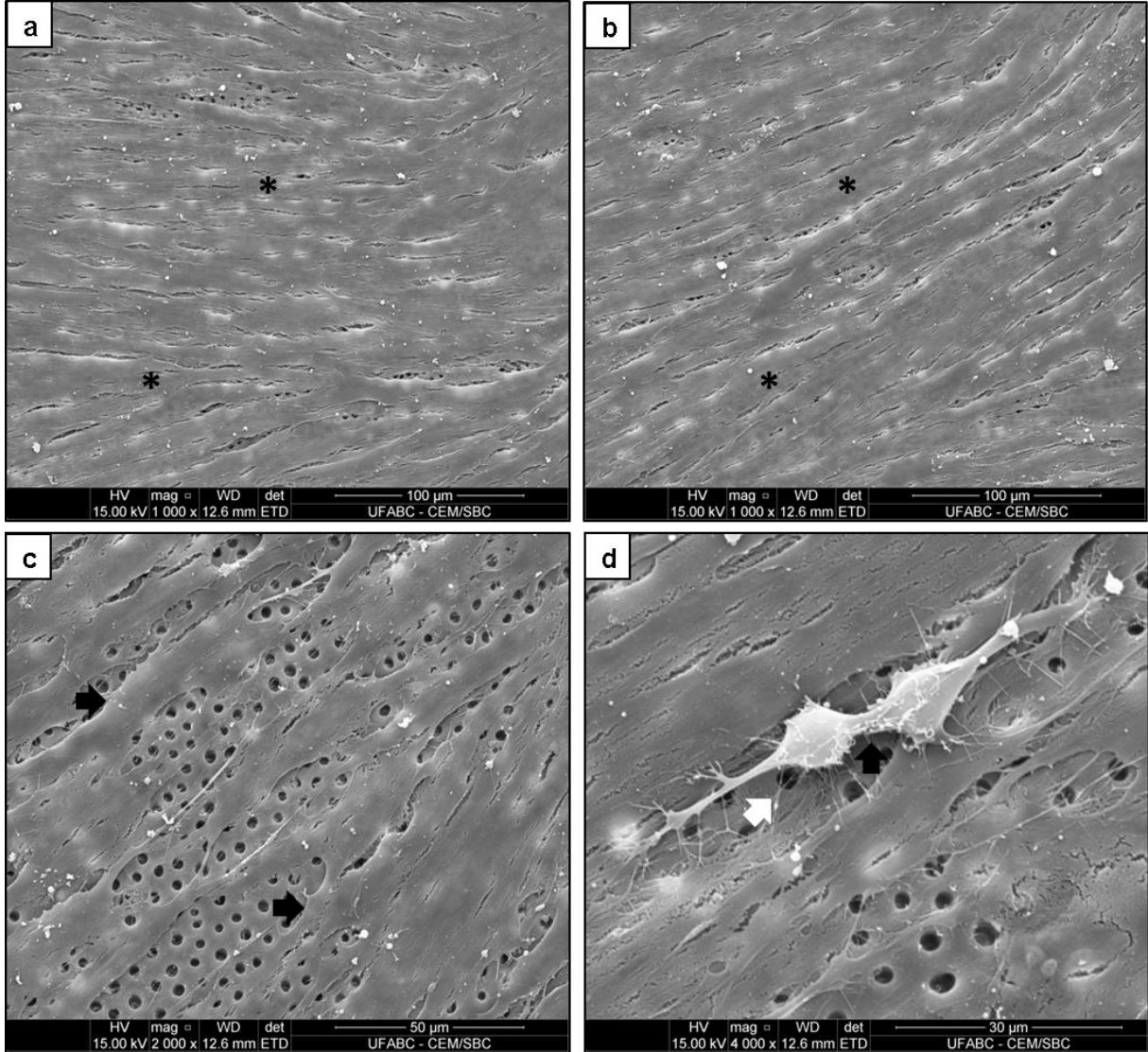
Fonte: Própria.

Figura 44 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



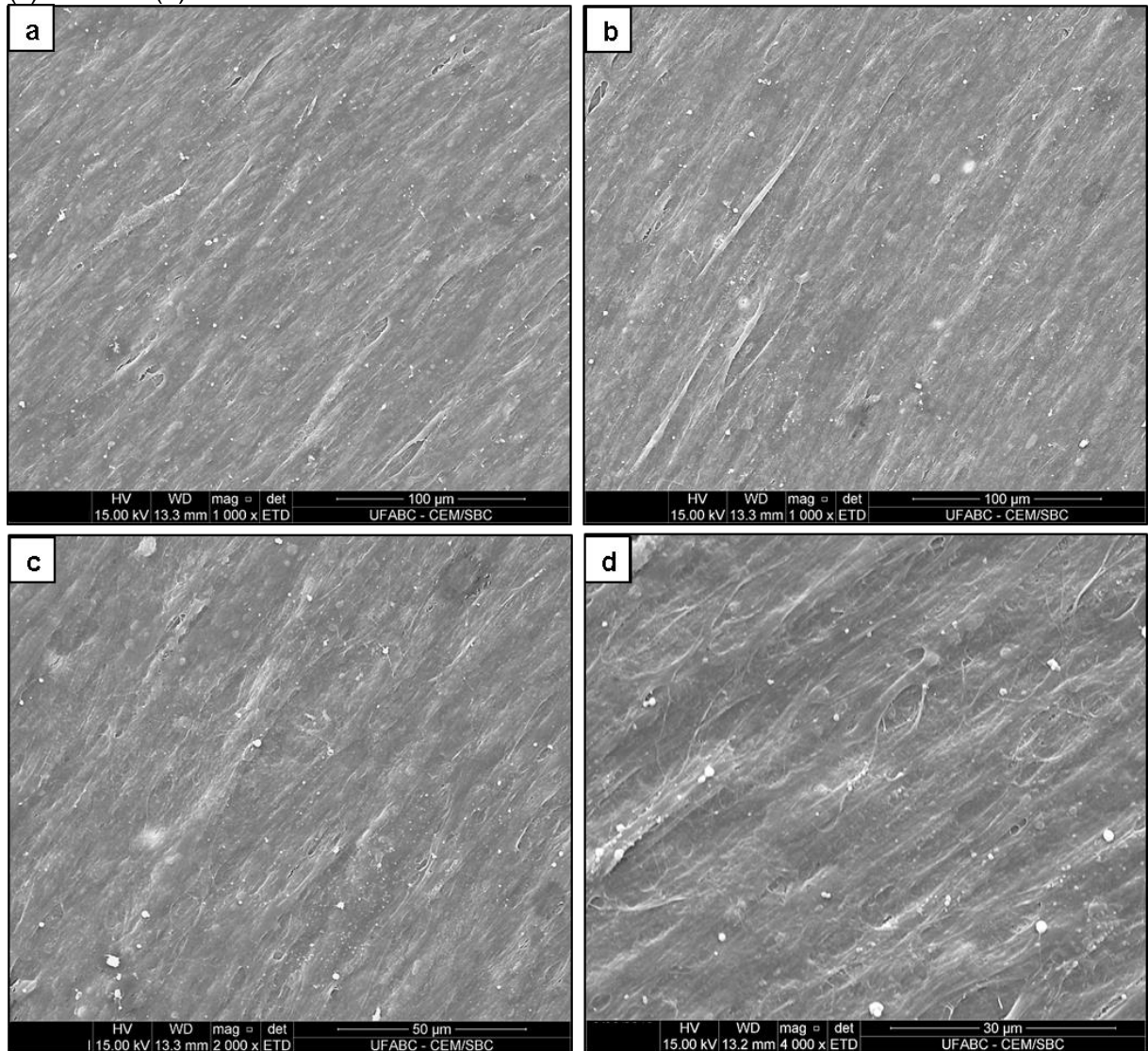
Fonte: Própria.

Figura 45 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Os asteriscos pretos evidenciam a monocamada de células (a e b). As setas pretas indicam as células e as setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (c e d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

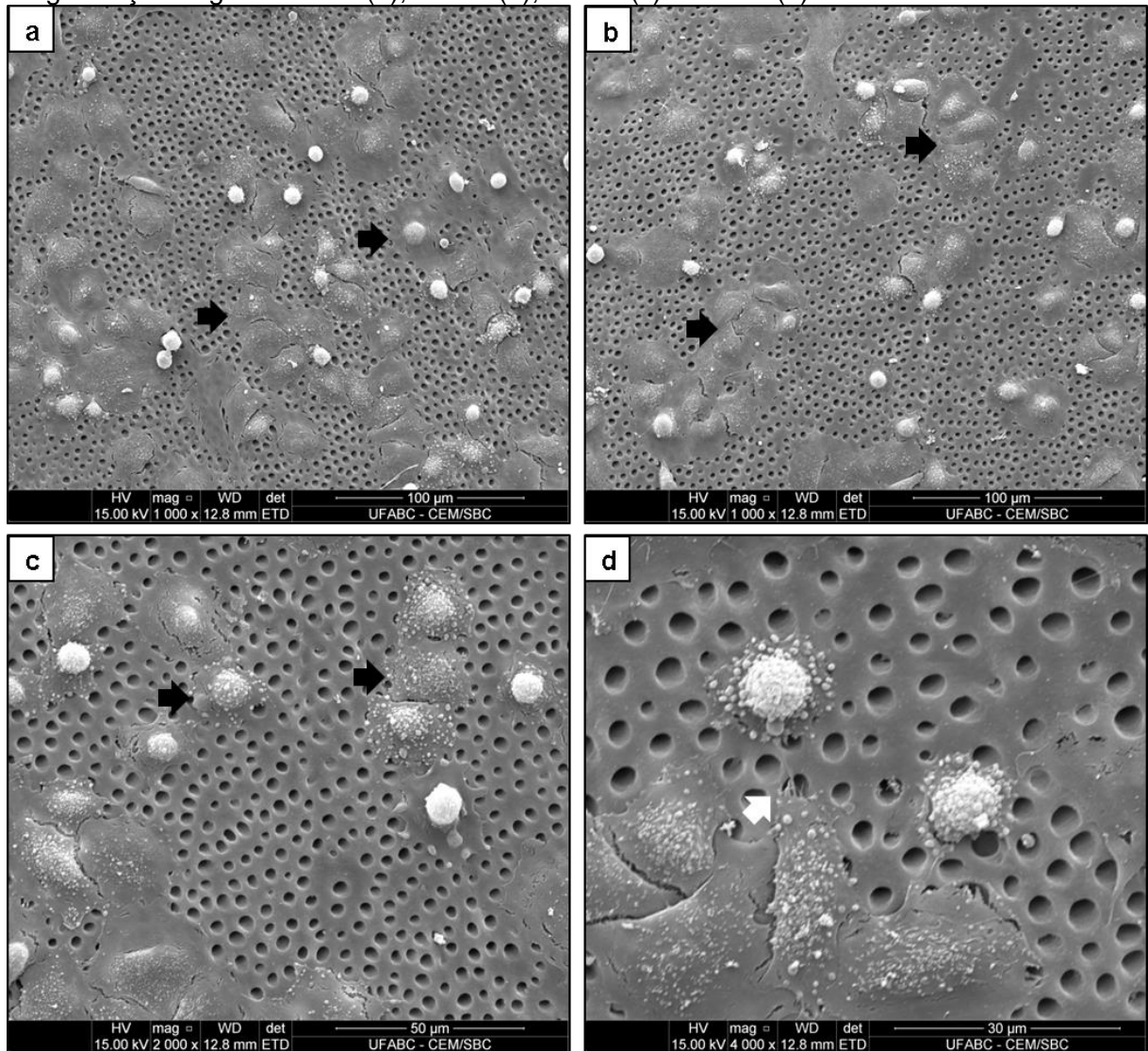
Figura 46 - Células sobre a dentina após o tratamento 2, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

As células inoculadas na dentina após o tratamento 3, em um período de duas horas de cultura, exibiam um padrão de comportamento semelhante aos demais tratamentos, sendo possível a observação do início do processo de espalhamento (Figura 47).

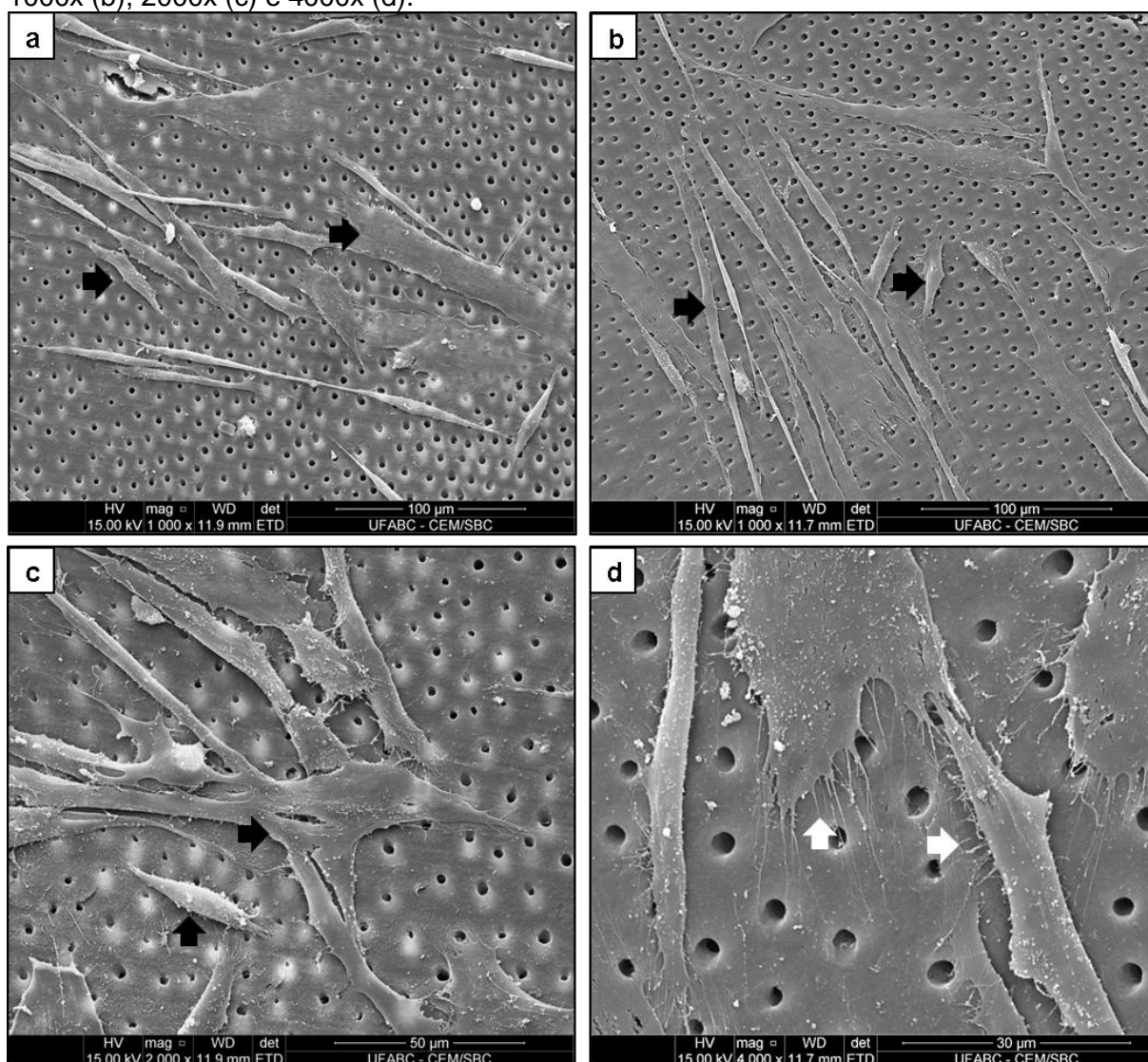
Figura 47 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com duas horas de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas evidenciam as células em adesão (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

No entanto, após 3 dias de cultura, foi verificado, na dentina após o tratamento 3, uma menor densidade de células, quando comparada aos outros grupos experimentais, e não foi observada a presença de células em divisão (Figura 8).

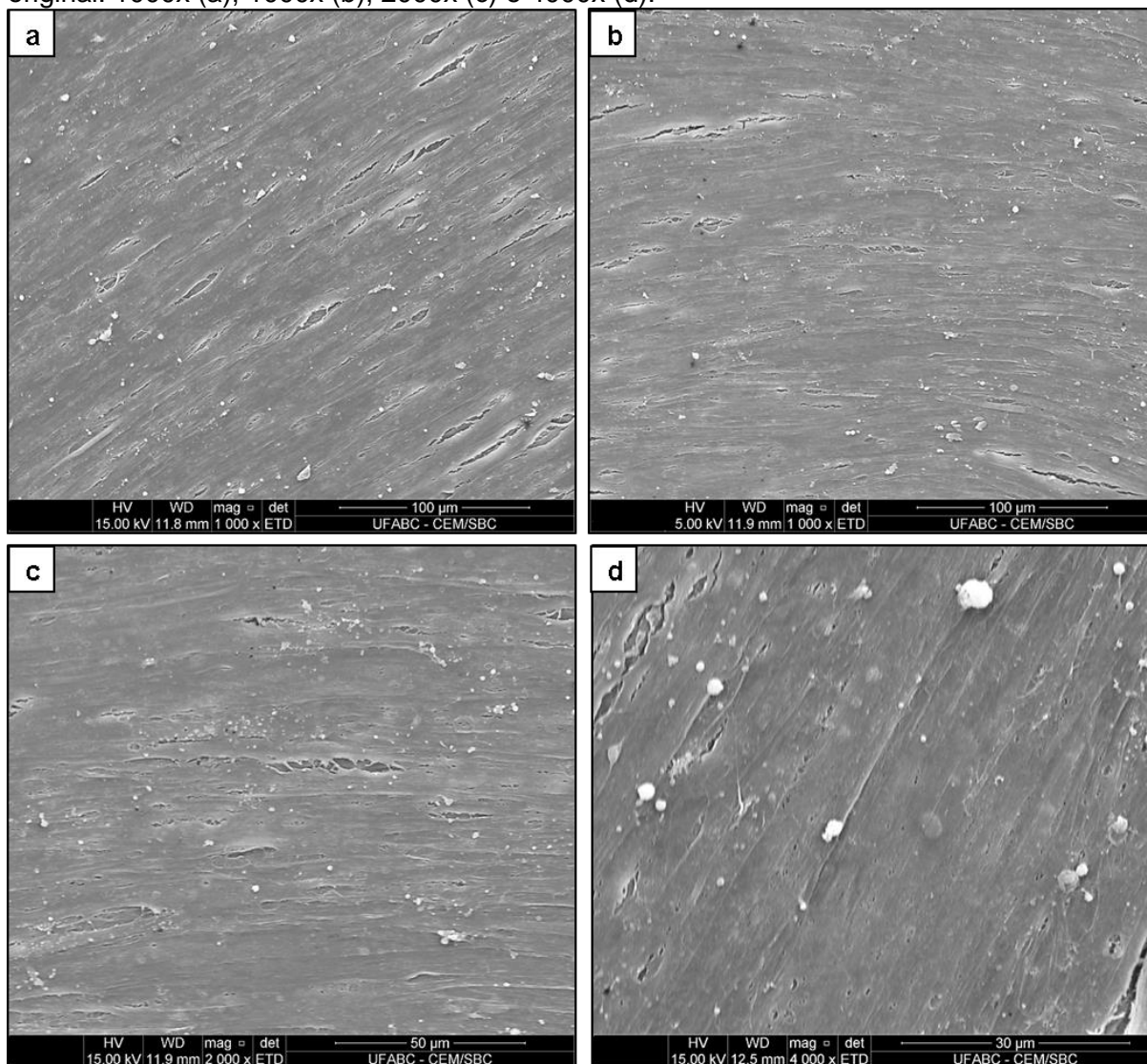
Figura 48 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com 3 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. As setas pretas indicam as células (a, b e c). As setas brancas destacam os filopódios e lamelipódios (d). Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

Porém, com 21 dias de cultura, foi observado, também na dentina com o tratamento 3, a formação de uma monocamada de células por toda a superfície do arcabouço (Figura 4).

Figura 49 - Células sobre a dentina após o tratamento 3, com 21 dias de cultura. Observação por microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original: 1. Magnificação original: 1000x (a), 1000x (b), 2000x (c) e 4000x (d).



Fonte: Própria.

6 DISCUSSÃO

Na engenharia de tecidos três elementos são considerados essenciais: as células, os arcabouços e os fatores indutores. Estes três componentes individuais e suas interações irão definir o sucesso da restauração tecidual desejada (CHAN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

A utilização das células-tronco é de grande interesse na engenharia de tecidos. As células-tronco podem ser isoladas de vários tecidos como, por exemplo, da polpa dentária (VERMA *et al.*, 2014). A obtenção das polpas, no presente estudo, variou de acordo com o estágio de reabsorção das raízes dos dentes. Foi verificado que, em dentes com um grau mais avançado de reabsorção radicular, a quantidade de tecido pulpar era pequena ou inexistente, constituindo desta forma, uma limitação para obtenção das SHED. Além disso, nos dentes com a câmara pulpar aberta e, conseqüentemente, com o tecido pulpar exposto, ocorreu uma maior taxa de contaminação, por bactérias e fungos, das culturas. Sendo tal, contaminação proveniente da própria cavidade oral dos voluntários.

Para o isolamento das SHED, dois procedimentos, que podem ser realizados de forma independente ou associados, são descritos na literatura, sendo eles: a técnica de cultivo de explante, na qual as células migram espontaneamente da polpa dentária para a superfície plástica dos frascos de cultura; e a digestão enzimática do tecido pulpar, em que se obtém uma suspensão de células dissociadas, após tratamento do tecido com enzimas específicas. Os métodos de obtenção e as condições de cultura utilizadas podem induzir a seleção de diferentes células *in vitro* (KARAMZADEH *et al.*, 2012; BASSO & BRACARENSE, 2013; LA NOCE *et al.*, 2014).

A dissociação enzimática é referida como sendo a técnica que seleciona células com uma maior taxa de proliferação e de marcação para células-tronco (KARAMZADEH *et al.*, 2012). No entanto, a dissociação enzimática pode provocar mais danos celulares que o cultivo de explante, devido à utilização de proteases, que podem afetar a viabilidade e o fenótipo das células (MCDUFFEE, 2012).

No procedimento com digestão enzimática das polpas dentárias são utilizadas com maior frequência as enzimas dispase e colagenase. No entanto, no estudo de Spath *et al.* (2010), os autores realizaram com sucesso o isolamento das

SHED empregando a enzima tripsina por 5 minutos nos tecidos pulpres. A tripsina apresenta a vantagem de ter um custo de aquisição menor do que as enzimas mais comumente empregadas.

Todavia, a tripsina é uma protease inespecífica, que cliva as proteínas nas ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou lisina e o grupo amino do aminoácido adjacente (SIMPSON, 2006). Desta maneira, a tripsina não apresenta seletividade para as proteínas extracelulares, podendo não ser tão eficaz quanto outras proteases específicas, como a colagenase.

O presente estudo verificou que o tratamento enzimático realizado auxiliou na liberação das células pela polpa, tendo em vista que o tempo de isolamento das células nas amostras tratadas com tripsina foi menor do que nas amostras sem a ação da enzima. Estes resultados estão de acordo com a pesquisa de McDuffee (2012) que igualmente relatou que a dissociação enzimática contribui na diminuição do tempo de obtenção de células progenitoras osteogênicas do tecido periosteal. Sendo assim, a tripsina teve ação na clivagem das proteínas extracelulares, rompendo a ligação das células com a matriz (ALBERTS *et al.*, 2010).

A ação da tripsina também foi evidenciada na observação das polpas por MEV (Figuras 8, 9 e 10). Nas amostras sem o tratamento enzimático, foi visualizada apenas a densa matriz extracelular do tecido pulpar, enquanto que, nas amostras tratadas com a enzima, as células estavam no exterior do tecido. Este fato pode ser devido à quebra das proteínas da matriz extracelular da superfície do tecido, expondo as células. No entanto, o período de cultura também contribui para a exteriorização das células, visto que a amostra sem tratamento com tripsina, mas que permaneceu em cultura por 35 dias, também exibiu células na superfície do tecido, porém em uma menor quantidade (Figura 11).

As células obtidas das polpas devem apresentar três critérios mínimos para serem classificadas como células-tronco mesenquimais, conforme descrito na literatura. Primeiramente, as células devem possuir aderência ao plástico, quando mantidas em condições normais de cultura. As células também devem exibir antígenos de superfície específicos, CD73, CD90 e CD105, e não possuir ou apresentar baixa expressão dos antígenos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II, quando avaliadas por citometria de fluxo. Por último, deve ser realizada a confirmação da plasticidade celular, ou seja, as células devem

apresentar a capacidade de se diferenciar em linhagens distintas como, por exemplo, em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; JESUS *et al.*, 2011).

Foi verificado que as células recém-isoladas das polpas já apresentavam adesão à superfície plástica dos frascos de cultura e essa característica se manteve após as realizações das subculturas (Figuras 12 e 13). As células obtidas apresentavam morfologia fusiforme, típica das células-tronco mesenquimais (JIAO *et al.*, 2014). Os núcleos exibiam múltiplos nucléolos, indicando a síntese de ácido ribonucleico ribossômico (ribonucleic acid – rRNA, ASHRI *et al.*, 2015).

Com a caracterização da adesão e morfologia das células também foi possível verificar se as culturas apresentavam contaminação. A contaminação constitui um dos principais problemas nas culturas celulares e, quando as células são destinadas à aplicação clínica, esse problema gera ainda mais preocupações. Contaminações por bactérias e fungos são geralmente mais fáceis de detectar, usando metodologias mais simples, como a microscopia de luz convencional, mas a identificação de infecção por micoplasma pode ser mais difícil. Um dos métodos utilizados para a detecção de micoplasma é através da coloração do DNA com um fluorocromo específico, como o DAPI. No presente estudo, com o uso da microscopia de luz (Figuras 12 e 13), não foi verificado indícios de contaminações bacterianas e fúngicas. Nas culturas coradas com DAPI não foi verificada a presença de objetos extranucleares fluorescentes (Figura 14). Desta forma, foi indicado que as culturas celulares estavam livres de contaminações (NIKFARJAM & FARZANEH, 2012).

A avaliação por citometria de fluxo (Figura 18) indicou que a amostra de células obtidas apresentou um padrão de expressão compatível com células-tronco mesenquimais, exibindo alta expressão do marcador para células-tronco mesenquimal CD73, CD90 e CD105 e expressão muito baixa para os marcadores de células hematopoiéticas CD34 e CD45 (ESLAMINEJAD *et al.*, 2010; JANG *et al.*, 2016).

A caracterização por diferenciação em diferentes linhagens celulares demonstrou a plasticidade das células cultivadas. Após 21 dias de cultura, as células foram coradas utilizando reagentes específicos capazes de evidenciar a diferenciação celular (DEUS *et al.*, 2012). Durante o processo de diferenciação

osteogênica, as células sintetizam a matriz inorgânica, com a deposição de cálcio no meio extracelular. O acúmulo de cálcio pôde ser observado, nos testes realizados (Figura 19), pela intensa coloração vermelha das culturas coradas com vermelho de alizarina (BIRMINGHAM *et al.*, 2012; SUNG, *et al.*, 2015; JANG *et al.*, 2016).

Com a indução da diferenciação adipogênica, as células iniciam a síntese de triglicerídeos, que se acumulam em gotículas lipídicas em seu citoplasma. O Oil Red O é um reagente que cora os lipídios, portanto, foi utilizado nas culturas destinadas à diferenciação adipogênica, colaborando para a visualização das gotículas lipídicas no interior de algumas células, como observado na Figura 20 (DEUS *et al.*, 2012; RIZZATTI *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2016).

Para diferenciação condrogênica, além do meio indutor utilizado, o sistema de cultura *in vitro* também influencia no sucesso da diferenciação. A cultura de micromassa possibilita que as interações célula-célula ocorram de forma semelhante às que acontecem durante a formação da cartilagem. Desta forma, esse sistema de cultura contribui para induzir a diferenciação condrogênica. Nos testes realizados foi observado que as células cultivadas com o meio para diferenciação permaneceram em cultura de micromassa pelos 21 dias do experimento, o que não foi observado nos grupos controles (Figura 21). O arranjo em micromassa colabora para que as células produzam uma matriz extracelular que contenha proteoglicanos, típicos da linhagem condrocita, que podem ser corados com azul de toluidina (KOYAMA *et al.*, 2012; ZULIANI *et al.*, 2018).

Os resultados dos ensaios da diferenciação *in vitro* indicam que as células obtidas apresentaram a capacidade de diferenciação nas três linhagens: osteogênica, adipogênica e condrogênica. No entanto foi verificado, igualmente a achados na literatura (MONTERUBBIANESI *et al.*, 2019), que as SHED exibem um maior potencial para diferenciação osteogênica do que para a diferenciação adipogênica, desta forma, esta população de células é mais indicada para utilização visando fins regenerativos dos tecidos ósseos.

Portanto, os resultados das caracterizações celulares indicam que os procedimentos utilizados para extração das células das polpas dentárias foram eficazes para obter uma população de SHED (DOMINICI *et al.*, 2006; JESUS *et al.*, 2011).

Na cultura de células-tronco determinados fatores podem influenciar na proliferação, morfologia e diferenciação celular. O envelhecimento das células, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é capaz de alterar tais propriedades celulares. Conforme relatado na literatura, quanto maior a idade do doador há um declínio na capacidade de proliferação e diferenciação das células em cultura. Esse decaimento da multipotência também é observado no envelhecimento das células *in vitro*, ou seja, quanto maior o número de subcultura (aumento no número de passagens) menor a capacidade de diferenciação das células em determinadas linhagens (ULLAH *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018).

O envelhecimento celular está relacionado com a diminuição da atividade da enzima telomerase. A telomerase é uma DNA polimerase específica que realiza a adição de DNA telomérico nos cromossomos. Os telômeros são sequências repetitivas de DNA existentes nas extremidades cromossômicas. Essas sequências são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência celular, como a manutenção da integridade cromossômica e a replicação completa dos cromossomos. Sem a atividade da enzima telomerase ocorre o encurtamento progressivo dos telômeros, a cada divisão celular, causando a perda da informação genética, que conduz à morte celular. Grande parte das células somáticas do organismo não sintetiza a enzima telomerase. Já nas células germinativas, progenitoras e tumorais, as telomerases se encontram ativas (PARSONS 2003; PERINI *et al.*, 2008; FERRER *et al.*, 2017; BRAZVAN *et al.*, 2018).

A verificação da estabilidade cromossômica das células mantidas em cultura foi realizada pela análise cariotípica. Na resolução da diretoria colegiada – RDC nº 214, é regulamento que, para o controle de qualidade das células em cultura, deve ser realizada a análise citogenética (BRASIL, 2018). Para realização deste teste, a mitose das células é interrompida na fase da metáfase com a utilização de um inibidor do fuso mitótico (colchicina). Desta forma é possível realizar a contagem cromossômica após a realização da coloração. O número de cromossomos encontrados em uma célula é específico da espécie; nos seres humanos, as células somáticas normais contêm 46 cromossomos (VEERABHADRAPPA *et al.*, 2016). No teste foi verificado que as células avaliadas apresentaram o conjunto normal de cromossomos da espécie humana (Figura 22).

A dentina foi escolhida para ser utilizada como arcabouço devido às suas propriedades atraentes para a cultura de células e implantação no organismo. A dentina é um material natural, sendo normalmente descartada após a extração dos dentes nas clínicas odontológicas. Estudos indicam que este biomaterial por apresentar uma estrutura constituída por hidroxiapatita, colágeno e fatores de crescimento é favorável para interação com as células, auxiliando no desenvolvimento e diferenciação celular. Atualmente, a dentina vem sendo proposta para utilização na restauração de diversos tecidos, como os dentários e ósseos (TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a, UM, 2018; SARI *et al.*, 2019).

Para esterilização das amostras de dentina foi escolhido o método de radiação gama. No trabalho de White *et al.* (1994), os autores realizaram a comparação entre quatro métodos para esterilização da dentina: radiação gama, óxido de etileno, calor seco e autoclavagem. O estudo supramencionado concluiu que, dos métodos avaliados, apenas a radiação gama não provocou alteração composicional, avaliada por espectroscopia FTIR, das amostras de dentina. O uso do óxido de etileno mostrou uma redução do fosfato, indicando perda de minerais na superfície dentinária. Neste mesmo estudo de White *et al.* (1994), os dados de espectroscopia FTIR da dentina após a esterilização por calor seco evidenciaram que esse procedimento provocou perda de água nas amostras, enquanto que o processo de autoclavagem causou uma diminuição dos componentes amida e fosfato nas dentinas testadas. Semelhante ao trabalho de Tran *et al.* (2015), a dose de radiação utilizada no presente estudo foi de 25 kGy, que se mostrou eficiente para esterilização, sendo já recomendada para enxertos ósseos (MERCAN *et al.*, 2018). Para avaliação dos efeitos desta dosagem sobre a dentina, neste presente estudo, foram realizadas avaliações também por espectroscopia FTIR, que demonstraram que as amostras não apresentaram alteração composicional significativa após o processo de esterilização por radiação gama (Figura 25). Esse resultado é importante, pois demonstra a eficácia do método em esterilizar a dentina (White *et al.*, 1994) sem provocar modificações em sua composição química, não interferindo, desta forma, nas etapas posteriores de análise.

O preparo da dentina requer o emprego de brocas e lixas para realização dos cortes nos dentes e remoção das camadas de esmalte e/ou cimento. O uso de tais equipamentos de corte ou abrasivos acaba por gerar um material que se deposita na

superfície da dentina, denominado magma dentinário (também conhecido como *smear layer*, lama dentinária, barro dentinário ou camada residual) (ARAÚJO *et al.*, 1998). O magma dentinário é composto principalmente por elementos orgânicos (colágeno e outras proteínas presentes) e inorgânicos (hidroxiapatita) dos tecidos dentários, assim como resíduos diversos dependendo do lubrificante ou outros produtos químicos usados durante o corte, além de saliva, sangue e microrganismos caso estejam presentes. Esses componentes aderem fracamente à superfície da dentina, formando uma camada que varia em quantidade, dependendo dos tipos de equipamentos utilizados para corte. Esta camada geralmente apresenta de 1 a 5 µm de espessura e pode penetrar até 40 µm para o interior dos túbulos dentinários. Sendo assim, o magma pode ser verificado com a utilização do microscópio eletrônico de varredura. A remoção dessa camada de magma pode ser realizada através da utilização de substâncias ácidas, ultrassom ou irradiação com laser de alta potência (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Para utilização como arcabouço, a desmineralização da dentina também é proposta como uma das etapas de seu preparo. Este tratamento contribui para a liberação dos fatores indutores presentes na estrutura da dentina, já que normalmente, os cristais de hidroxiapatita bloqueiam a liberação destes fatores (KIM *et al.*, 2013). A desmineralização ainda auxilia na remoção da camada de magma (LI *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2015; TABATABAEI *et al.*, 2016a). Os protocolos utilizados, no presente estudo, para o preparo da dentina foram escolhidos com base nos procedimentos encontrados na literatura que utilizam a dentina como enxerto em defeitos ósseos e como arcabouço para a própria restauração dentária (HUANG *et al.*, 2006; YAGIHASHI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; MURATA *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2015; BAKOPOULOU *et al.*, 2016; TABATABAEI *et al.*, 2016a; UM *et al.*, 2017). Os tratamentos empregados devem produzir uma desmineralização otimizada, pois o excesso pode destruir a estrutura da dentina, danificando proteínas e outros elementos da matriz dentinária. Entretanto, a desmineralização insuficiente pode gerar um arcabouço com propriedades menos indutoras para diferenciação das células (TABATABAEI *et al.*, 2016b).

O tratamento 1, com o uso combinado do EDTA e limpeza ultrassônica, tem se mostrado eficaz no preparo da dentina. O EDTA é considerado um dos agentes mais efetivos na desmineralização e remoção da camada de magma. O EDTA atua

como um quelante de cálcio da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Os oxigênios, presente na estrutura do EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), realizam ligações com os íons cálcio, incorporando estes à sua estrutura (REIS, 2006). A desmineralização com a variação decrescente da concentração de EDTA, adotada neste estudo, foi considerada importante para manter as proteínas funcionais (LI *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2015; BAKOPOULOU *et al.*, 2016).

O tratamento 2, que utiliza EDTA e ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), tem sido sugerido, pois ambos os reagentes são eficazes como substâncias quelantes do cálcio presente na hidroxiapatita (HUANG *et al.*, 2006; TRAN *et al.*, 2015).

No tratamento 3 foi utilizado ácido clorídrico (HCl), pois esse reagente tem a capacidade de produzir uma desmineralização mais completa da dentina. Neste tratamento, os íons hidrogênio (H^+) da solução aquosa de ácido clorídrico reagem com os íons hidróxido (OH^-) da hidroxiapatita, provocando sua dissolução (YAGIHASHI *et al.*, 2009; TOGARI *et al.*, 2011; MURATA *et al.*, 2012).

Os resultados decorrentes da avaliação da perda de massa revelaram que apenas o tratamento 3 gerou uma perda estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle (Figura 26). Este resultado está de acordo com achados na literatura (REIS, 2006; YAGIHASHI *et al.*, 2009; MURATA *et al.*, 2012) que indicam que o tratamento com HCl promove uma maior desmineralização da dentina. No entanto, a ação das substâncias utilizadas nos procedimentos, para desmineralização, pode variar de acordo com o tempo de aplicação, pH e concentração (REIS, 2006; YAGIHASHI *et al.*, 2009; MURATA *et al.*, 2012).

Para observação da estrutura das dentinas foi empregado o microscópio eletrônico de varredura. Através da interação do feixe de elétrons do equipamento com as amostras de dentina, foi possível verificar que todos os procedimentos realizados pra desmineralização provocaram uma maior exposição dos túbulos dentinários, em comparação com amostras controle (Figuras 27, 28, 29 e 30). As amostras de dentina do grupo controle apresentaram uma pequena obstrução dos túbulos, não sendo observada a formação de uma camada de magma em sua superfície. Este fato é provavelmente devido à realização da lavagem, utilizando a cuba ultrassônica, que foi eficiente para remoção de grande parte dos resíduos gerados pelo procedimento de lixamento (REIS, 2006).

Com a comparação das imagens das dentinas desmineralizadas é possível observar que ocorreu uma alteração na superfície das amostras após o tratamento 3 (Figura 30). Esse resultado vai de encontro, com a análise da perda de massa, na qual esse tratamento apresentou uma perda de quase 45%. Como mencionado anteriormente, a desmineralização contribui para a liberação de fatores indutores (GUO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012; TABATABAEI *et al.*, 2016b), no entanto, não é desejável que os tratamentos produzam uma deformação nas dentinas. Sendo assim, o tratamento com HCl, no período de sete dias (tratamento 3), pode ter excedido o ideal para a produção dos arcabouços. Períodos menores de tempo podem ser testados para avaliação deste tratamento nas dentinas.

A análise por FTIR foi realizada a fim de verificar se os procedimentos de desmineralização provocaram alterações químicas nas superfícies das amostras de dentina. A técnica de FTIR é uma espectroscopia vibracional indicada para a caracterização de tecidos biológicos, como os dentários, pois seu espectro fornece informações sobre os componentes orgânicos e inorgânicos da matriz extracelular. Com a utilização desta técnica o conteúdo relativo destes componentes pode ser estimado (análise semi-quantitativa) a partir do cálculo das razões entre as áreas das bandas do espectro (BACHMANN *et al.*, 2003; ZECELL *et al.*, 2015).

A porção orgânica da matriz dentinária é constituída predominantemente de colágeno. No espectro FTIR esta parte da matriz é evidenciada pela presença dos picos correspondentes às amidas I (estiramento de C=O em 1645 cm^{-1}), II (combinação fora de fase da flexão de N-H e do estiramento de C-N em 1553 cm^{-1}) e III (associação do estiramento de C-N e deformação de N-H em 1240 cm^{-1}), além de outros picos (modos de vibração em 1340 , 1283 e 1202 cm^{-1}). A matriz inorgânica é composta em sua maior parte de cristais de hidroxiapatita carbonatada e seus componentes absorvidos no infravermelho são o carbonato e o fosfato (BACHMANN *et al.*, 2003; ZECELL *et al.*, 2015).

Com os resultados, foi observado que tanto o grupo controle como os tratamentos exibiram os picos de absorção característicos da dentina descritas na literatura (BACHMANN *et al.*, 2003; BOTTA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014). Como os picos dos grupos químicos referentes à matéria inorgânica ainda estavam presentes nos espectros de todas as amostras de dentina, foi evidenciado que os métodos de desmineralização não removeram completamente os minerais das amostras (Figura

30). No entanto, a desmineralização completa não é desejada, uma vez que pode prejudicar a estrutura da dentina e afetar os fatores indutores (TABATABAEI *et al.*, 2016b).

Os tratamentos contribuíram para remoção de parte dos minerais das amostras, como foi possível observar pelo aumento da razão entre os grupos amidas em relação ao fosfato, havendo uma progressão da desmineralização entre os tratamentos 1, 2 e 3 (Figura 32). O tratamento 3 mostrou a maior capacidade para remoção dos minerais, estando de acordo com a avaliação da perda de massa, além de ter causado alteração no modo de vibração do fosfato remanescente. A retirada dos componentes da matriz inorgânica expôs a parte orgânica da matriz, sendo evidenciada pela presença dos grupos amidas com um aumento inversamente proporcional à perda dos componentes inorgânicos.

A dentina desmineralizada, com destaque para as amostras submetidas aos tratamentos 2 e 3, possuíram um teor de água maior que o grupo controle, evidenciado pelo aumento da intensidade relativa da banda de OH⁻ (Figura 32). Este aumento é devido, em maior parte, pela perda de minerais em torno das fibrilas de colágeno, mas também pela ampliação dos túbulos dentinários, devido à perda de dentina peritubular (KIM *et al.*, 2010). Portanto, os tratamentos para desmineralização contribuíram para a retenção de uma quantidade maior de água na estrutura tridimensional das amostras de dentina. Para serem usados para fins biomédicos, os arcabouços devem apresentar a capacidade de absorver fluidos, pois, após implantação no organismo, deve ocorrer uma distribuição adequada de metabólitos e nutrientes por todo o arcabouço (RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2015). Essa modificação na permeabilidade, também favorece a liberação de fatores de crescimento da estrutura da dentina (GUO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012).

Na caracterização dos biomateriais é necessário também conhecer sua resistência mecânica, para que essa seja compatível com o local no qual se pretende a implantação. Um dos ensaios mecânicos normalmente utilizados para materiais cerâmicos é o conduzido sob compressão. Neste ensaio, uma força compressiva é aplicada na amostra, provocando sua contração ao longo da direção da tensão. O teste mecânico de compressão é indicado para avaliação da resistência mecânica das dentinas, pois este ensaio determina a carga máxima que

a dentina pode suportar e como os tratamentos influenciam neste valor (CALLISTER & RETHWISCH, 2012; CATELLO *et al.*, 2017).

De acordo com a análise estatística realizada, os grupos dos tratamentos 1 e 2 apresentaram limites de resistência à compressão (valores de tensão no ponto máximo da curva de tensão-deformação) similares ao controle, enquanto o tratamento 3 exibiu valor significativamente menor (Figura 33). O grupo tratamento 3 sofreu uma deformação estatisticamente maior antes da ruptura em comparação aos demais grupos. A julgar por esses valores de tensão e deformação, as amostras submetidas ao tratamento 3 podem ser consideradas mais dúcteis, ou seja, menos frágeis que as dos demais grupos (CALLISTER & RETHWISCH, 2012; CHUN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

As propriedades mecânicas da dentina são determinadas pela sua estrutura e composição. Uma maior quantidade de matéria inorgânica possibilita que a dentina apresente um maior limite de resistência à compressão, como observado nos grupos controle e tratamentos 1 e 2. Pela análise do comportamento das curvas apresentadas, é possível inferir que os grupos experimentais controle e tratamento 1 apresentam tensão de ruptura e deformação total bastante similares entre si. No entanto, essas amostras são mais frágeis pela ausência de regime plástico do material. Como demonstrado pelo ensaio de resistência à compressão e FTIR, as amostras submetidas ao tratamento 3, que sofreu maior desmineralização (diminuição da porção inorgânica), apresentaram um limite de resistência menor, mas apresentaram uma maior deformação a baixas tensões, revelando um comportamento compatível com um polímero elástico, o que sugere uma maior contribuição da fase orgânica da dentina. De fato, pelo comportamento da curva média apresentada, é possível sugerir que não apenas o conteúdo mineral foi alterado com o tratamento, mas também a estrutura do colágeno.

O teste mecânico contribui para indicar o grau no qual as amostras de dentina irão se deformar antes da fratura (CALLISTER & RETHWISCH, 2012; CHUN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Vale a pena ressaltar que aspectos como quantidade e orientação dos túbulos dentinários interferem no comportamento físico do material, uma vez que a fase orgânica contribui para a tenacidade da dentina pois absorve mais energia, enquanto que a fase inorgânica contribui para a rigidez do material. No presente estudo, foram preparadas amostras de iguais dimensões provenientes do

terço médio da coroa de dentes molares humanos, cuja orientação dos túbulos se dá de forma quase perpendicular à força aplicada; portanto, a contribuição da orientação dos túbulos no teste foi minimizada a partir do momento que todas as amostras foram preparadas de forma igual, a partir da mesma região dos dentes molares. Diferenças na quantidade de túbulos, assim como na composição e diâmetro, podem ocorrer, pois as amostras foram preparadas de dentes de indivíduos diferentes e submetidas a tratamentos diferentes. Embora apresentem comportamento similar, a ligeira maior resistência à tensão que o tratamento 1 apresenta, em relação ao grupo controle, pode ser explicada em função do afrouxamento das fibras colágenas e exposição da fase inorgânica da dentina, o que leva à perda da fase mecânica desta fase. O comportamento mecânico observado das amostras submetidas aos tratamentos 1, 2 e 3 é esperado, pois condiz com a perda de mineral estatisticamente significativa detectada pela análise de FTIR (tratamentos 2 e 3), enquanto que o tratamento 1, embora tenha apresentado sinais de desmineralização, a mesma não foi estatisticamente significativa para nenhum dos componentes analisados (Figura 32).

Além das avaliações físico-químicas de um biomaterial, a análise da biocompatibilidade é indispensável para a caracterização de um dispositivo biomédico, como o arcabouço. Os primeiros ensaios indicados de biocompatibilidade são os de citotoxicidade *in vitro* (ROGERO *et al.*, 2003; ISO 10993-5, 2009). Existem três categorias de testes de citotoxicidade: teste de extrato, teste de contato direto e teste de contato indireto, que consistem basicamente em colocar os arcabouços direta ou indiretamente em contato com as células e avaliar alterações nos diferentes parâmetros celulares, como morfologia, padrão de crescimento e metabolismo (ROGERO *et al.*, 2003; ISO 10993-5, 2009).

No presente estudo foi realizado o teste de extrato que, segundo a literatura, é apropriado para detectar a toxicidade de substâncias solúveis do arcabouço e se mostra compatível com os resultados obtidos *in vivo* (LI *et al.*, 2015). Por não haver um contato direto dos materiais com a camada celular, este teste previne possível danos mecânicos às células decorrentes da movimentação das amostras nos poços das placas de cultura (MASSON & LOMBELLO, 2016).

O teste do extrato também possibilita a observação da alteração do pH do meio de cultura após contato com os arcabouços. Essa análise é possível em

decorrência do meio apresentar um indicador de pH (vermelho de fenol), que permite a determinação aproximada do pH. O vermelho de fenol é amplamente utilizado nos meios de cultura como indicador por não apresentar toxicidade para as células (REBELLO, 2014).

O pH ótimo para a proliferação celular pode variar de acordo com o tipo de célula. Entretanto, a maioria das linhagens apresenta o valor ideal de 7,4. As células em cultura podem apresentar uma diminuição da proliferação se o pH oscilar de 7 para 6,5 e perder a viabilidade entre 6,5 e 6. Portanto, os meios de cultura com vermelho de fenol devem apresentar, idealmente, uma coloração vermelha-clara (pH de 7,4). Alterações no pH irão provocar mudanças na coloração do meio, por exemplo, a coloração vermelha-escura indica um pH de 7,6, roxa de 7,8 e amarela de 6,0 a 6,5. (PERES & CURI, 2005; REBELLO, 2014).

Desta forma, é possível constatar, pela observação da coloração dos meios de cultura em contato com as amostras testadas (Figura 34), que os arcabouços do tratamento 3 provocaram uma diminuição do pH (cor amarela). As amostras do grupo controle e dos outros tratamentos não provocaram mudanças no pH, mantendo o meio com uma coloração vermelha-clara.

A análise qualitativa (morfológica) da citotoxicidade mostrou que as células em contato com os extratos das dentinas sem tratamento (controle) e submetidas aos tratamentos 1 e 2 apresentaram um padrão de crescimento similar ao controle negativo (não citotóxico), não sendo observados sinais de degeneração celular (Figuras 35 e 36). Sendo assim, conforme classificação morfológica descrita pela ISO 10993-5 (2009), para testes de citotoxicidade de extratos, esses materiais não induziram efeitos tóxicos as células. Este resultado era esperado para o grupo das dentinas controle, pois se trata de um material próprio do corpo humano, ou seja, de origem natural (CUNHA *et al.*, 2011). No entanto, os tratamentos desmineralizantes realizados poderiam induzir modificações na morfologia ou no padrão de crescimento das células. No tratamento 3 foi verificada uma diminuição do crescimento celular. No controle positivo, as células exibiam morfologia arredondada, e foi verificada também uma diminuição do crescimento celular, corroborando a natureza citotóxica do fenol.

A quantificação da viabilidade celular do teste de citotoxicidade foi avaliada de forma indireta, através da medição da atividade mitocondrial das células pelo

ensaio do MTT (Figura 37). Neste teste, os níveis de cristais de formazan formados, devido à redução do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis, apresentam uma correlação positiva com o número de células viáveis na cultura (MOSMANN, 1983; EDUARDO *et al.*, 2008).

Com os resultados, foi verificado que apenas o tratamento 3 apresentou um potencial citotóxico para as células, pois este tratamento reduziu mais de 70% a viabilidade celular, quando comparado com o controle negativo (ISO 10993-5, 2009). O teste quantitativo está de acordo com a análise qualitativa da citotoxicidade e com a observação da coloração dos meios de cultura em contato com as amostras, corroborando os resultados dos efeitos dos extratos nas culturas celulares. Desta forma, foi verificado que o procedimento de lavagem realizado foi suficiente para remoção dos agentes desmineralizantes dos tratamentos 1 e 2; no entanto, para o tratamento 3 se faz necessário um tempo maior de lavagem para eliminação dos fatores citotóxicos.

A análise da interação das células com os arcabouços por MEV permitiu examinar os padrões de comportamento celular para cada tipo de preparo da dentina (Figuras 38 a 49). Os quatro grupos testados de dentina mostraram capacidade de proporcionar a adesão celular, visto que, no período de 2 horas após a inoculação, as células já estavam se espalhando pelos arcabouços. No terceiro dia de cultura, as células presentes nas dentinas controle e submetidas aos tratamentos 1 e 2 formaram uma camada em grande parte da superfície dos arcabouços. Todavia, as dentinas submetidas ao tratamento 3 apresentaram uma baixa densidade de células, corroborando o potencial citotóxico deste tratamento.

No entanto, após os 21 dias de cultura, todos os arcabouços de dentina apresentaram uma alta densidade de células em suas superfícies, que se organizavam em multicamadas. Esse padrão foi observado inclusive no tratamento 3, que inicialmente apresentou uma menor quantidade de células, o que pode ser atribuído às trocas de meio realizadas durante o período de cultura, que contribuíram para eliminação dos fatores citotóxicos. Estes resultados confirmam a necessidade da realização de um maior tempo de lavagem para os arcabouços deste tratamento.

As células nas dentinas apresentavam filopódios e lamelipódios que se projetavam sobre suas superfícies; no entanto, essas projeções não entraram nos

túbulos dentinários, como acontece com as expansões citoplasmáticas dos odontoblastos, que migram para dentro dos túbulos (NEUNZEHN *et al.*, 2017) Os filopódios e lamelipódios da membrana plasmática são ricos em actina e seu alongamento propõe a borda das células para frente promovendo a migração ou extensão celular. Essas estruturas também estão envolvidas no processo de adesão (MATTILA *et al.*, 2008).

Na superfície celular ainda foram averiguadas muitas irregularidades, como as vesículas extracelulares, evidenciando a manutenção da atividade metabólica das células nas culturas (ESPOSITO *et al.*, 2007). As vesículas extracelulares são estruturas de dupla membrana que contribuem para a comunicação intercelular, através da transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Esses fatores parácrinos liberados pelas células-tronco desempenham um importante papel na transferência de sinais regenerativos das células para os tecidos lesionados (GRANGE *et al.*, 2014; GARIKIPATI *et al.*, 2018; RAPOSO & STORVOGEL 2018).

Com base nas análises realizadas, foi evidenciado que a dentina forneceu suporte favorável para a adesão e proliferação das células SHED. No entanto, o tratamento 3 apresentou um potencial citotóxico que, em caso de implante no organismo, poderia gerar um processo inflamatório que levaria à destruição do enxerto. A dentina do grupo controle demonstrou ser adequada para dar suporte ao crescimento celular; todavia, como descrito na literatura, os tratamentos desmineralizantes possibilitam que os fatores de crescimento presentes em sua estrutura fiquem disponíveis para ação sobre as células, contribuindo para as propriedades osteoindutora e osteocondutora da dentina. Desta forma, as dentinas submetidas aos tratamentos 1 e 2 mostraram melhores características para serem utilizadas na engenharia de tecidos. Essas dentinas demonstraram biocompatibilidade e foram capazes de sustentar o crescimento das células-tronco em um período que possibilite sua diferenciação. Com destaque para o tratamento 2, que exibiu uma desmineralização que não provocou deformação na estrutura da dentina e na resistência a tensão, mas foi capaz de aumentar a permeabilidade da dentina, que segundo a literatura (GUO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012) contribui para a liberação dos fatores indutores.

Desta forma, a dentina de dentes permanentes se mostrou favorável para utilização como arcabouços, visando a engenharia de tecidos ósseos. Em virtude de

suas dimensões e composição seu uso se faz mais adequado para defeitos no osso alveolar. Outro aspecto que pode ser ressaltado é que a dentina de dentes decíduos também pode ser avaliada para o uso como arcabouço. Os dentes decíduos são esfoliados naturalmente; portanto têm maior disponibilidade. Esses dentes poderiam, inclusive, ser armazenados para um futuro uso autólogo, minimizando os riscos de rejeição.

Portanto, como analisado neste estudo, encontrar a técnica de preparação para transformar os dentes em arcabouços de dentina adequados, representa uma etapa fundamental para a utilização clínica deste material, visando a regeneração tecidual. Para isso, se faz necessário avaliar com critério todas as etapas de seu preparo, tais como: a remoção de agentes biológicos contaminantes, a fim de evitar infecções; a realização de um processo adequado de desmineralização, para disponibilizar os fatores indutores e expor os componentes orgânicos, com o objetivo de estimular as células-tronco, mas que também preserve a parte inorgânica, pra manter a estrutura e resistência do material; e a eliminação de substâncias citotóxicas, que podem provocar reações inflamatórias, levando a rejeição do arcabouço após implante no organismo.

Este estudo se constitui em avaliações *in vitro*; para a utilização *in vivo*, visando a engenharia de tecidos ósseos, mais pesquisas se fazem necessárias para compreensão de como estes materiais influenciam o desenvolvimento e diferenciação das células em ambiente fisiológico (UM *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2019; SARI *et al.*, 2019).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1 - Foi possível obter células-tronco mesenquimais da polpa dentária pela combinação dos métodos de cultivo de explante e dissociação enzimática. Portanto, a tripsina se mostrou eficiente para o isolamento das SHED, após as polpas serem tratadas;

2 - As SHED obtidas apresentaram elevada capacidade de diferenciação osteogênica, não exibiram contaminações e a estabilidade cromossômica foi mantida no período de cultura;

3 - A obtenção dos arcabouços de dentina foi possível com a utilização de uma metodologia acessível;

4 - A radiação gama, na dose de 25 kGy, foi eficiente para esterilização das amostras e não causou mudanças na composição química dos arcabouços de dentina;

5 - A análise da composição química por FTIR das amostras de dentina mostrou que o tratamento 3 foi o que apresentou maior perda da porção mineral, seguido dos tratamentos 2, 1 e controle. A diminuição da matriz inorgânica resultou na maior exposição da porção orgânica nos grupos tratados. A avaliação da perda de massa corroborou o resultado do teste de FTIR, mostrando que o tratamento 3 foi o mais agressivo na desmineralização das amostras;

6 - O teste de resistência mecânica, por compressão, indicou que a desmineralização das amostras do tratamento 3 provocou uma diminuição da resistência à compressão, tornando o material mais dúctil;

7 - O tratamento 3 foi citotóxico para a cultura de SHED. Portanto, para sua utilização se faz necessário a realização de mais procedimentos de lavagens. Os demais tratamentos foram aptos para utilização em culturas células;

8 - As SHED apresentaram adesão e espalhamento sobre a superfície das dentinas após todos os tratamentos propostos, demonstrando que a dentina apresenta boas características para interação com as células. As dentinas desmineralizadas pelos tratamentos 1 e 2 exibiram características mais propícias para serem utilizadas na regeneração de lesões em osso alveolar..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS R. L. P. **Cell culture for biochemists**. 2 ed. New York: Elsevier, 1990. 364p.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J., *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. 1395 p.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681. 2000.
- ARANA, V.; BRADASCHIA, V. **Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos**. 1 ed. GEN Guanabara Koogan, 2012. 328 p.
- ARAÚJO, M. A. J.; RODE, S. M.; VILLELA, L. C., *et al.* Avaliação qualitativa do efeito de agentes de limpeza na camada de lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 12, n. 2, p. 99-104, 1998.
- ASHRI, I N. Y.; AJLAN, S. A.; ALDAHMAH, A. M. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. **Saudi Med J**, v. 36, n. 12, p.1391-1399, 2015.
- BACHMANN, L.; DIEBOLDER, R.; HIBST, R., *et al.* Infrared absorption bands of enamel and dentine tissues from human and bovine teeth. **Appl Spectr Ver**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2003.
- BAKOPOULOU, A.; ABOUT, I. Stem cells of dental origin: current research trends and key milestones towards clinical application. **Stem Cells Int**. Article ID. 4209891, 20p, 2016.
- BAKOPOULOU A, PAPACHRISTOU E, BOUSNAKI M, *et al.* Human treated dentin matrices combined with Zn-doped, Mg-based bioceramic scaffolds and human dental pulp stem cells towards targeted dentin regeneration. **Dent Mater**, v. 32, n. 8, p. 159-175, 2016.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C.; DUEK E. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. RODRIGUES L. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, s. 2, p. 3951 - 3958, 2013.
- BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 352p.
- BENETTI, C.; ANA, P. A.; BACHMANN, L., *et al.* Mid-Infrared Spectroscopy Analysis of the Effects of Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet

(Er,Cr:YSGG) Laser Irradiation on Bone Mineral and Organic Components. **Appl Spectrosc**, v. 69, n. 12, p. 1496-1504, 2015.

BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G. L.; MCHUGH, P. E. *et al.* Steogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **European Cells and Materials**, v. 23, p. 13–27, 2012.

BOTTA, S. B.; ANA P. A.; SANTOS, M. O., *et al.* Effect of dental tissue conditioners and matrix metalloproteinase inhibitors on type I collagen microstructure analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. **J Biomed Mater Res Part B**, v. 100, n. 4, p. 1009-1016, 2012.

BOUET, G.; BOULEFTOUR, W.; JUIGNET, L., *et al.* The impairment of osteogenesis in bone sialoprotein (BSP) knockout calvaria cell cultures is cell density dependent. **Plos One**, v. 10, n. 2, e0117402, 2015.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D., *et al.* Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 137-146, 1996.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC Nº 214**, de 7 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências. Brasília, 2018.

BRAZVAN, B.; EBRAHIMI-KALAN, A.; VELAEI, K., *et al.* Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence. **Biomed Pharmacother**, v. 102, p. 9-17, 2018.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H., *et al.* Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, n. 1, p. 53 - 62, 2010.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 817 p.

CARDOSO, M.; BALDUCCI, I.; TELLES, D. M., *et al.* Edentulism in Brazil: trends, projections and expectations until 2040. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p.1239-1246, 2016.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. 380 p.

CATELLO, J. D. C.; DÓRIA, R. G.S.; FANTINATO N., *et al.* Estudo comparativo da resistência mecânica da força de compressão entre biomateriais naturais, sintéticos e mistos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 91-96, 2017.

CHAN, B. P.; LEONG K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **Eur Spine J**, v. 17, p. S467- S479, 2008.

CHUN, K. J.; CHOI, H. H.; LEE, J. Y. Comparison of mechanical property and role between enamel and dentin in the human teeth. **J Dent Biomech**, v.5, 2014.

CIRANO, F. R.; TOGASHI, A. Y.; LIMA, L. A. P. A., *et al.* Uso da BMP-2 e 7 na promoção da osseointegração às superfícies dos implantes de titânio. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 25, n. 4, p. 443-448, 2007.

CONDE, M. C. M.; CHISINI, L. A.; GRAZIOLI, G., *et al.* Does cryopreservation affect the biological properties of stem cells from dental tissues? A systematic review. **Braz Dent J**, v. 27, n. 6, p. 633 - 640, 2016.

CORDEIRO, M. M.; DONG, Z.; KANEKO, T., *et al.* Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v. 34, v. 8, p. 962-969, 2008.

COURTENAY, J. C.; SHARMA, R. I.; SCOTT, J. L. Recent advances in modified cellulose for tissue culture applications. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.

CUNHA, C.; PANSERI, S.; ANTONINI, S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. **Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 50-59, 2011.

DEUS, G. C.; NORMANTON, M.; HAMERSCHLAK, N., *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters. **Einstein**, v. 10, n. 3, p. 296 - 301, 2012.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J., *et al.* Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 535-542, 2013.

DRENGK, A.; ZAPF, A.; STÜRMER, E. K., *et al.* Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n. 5, p. 317–326, 2009.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 4, p. 315-317, 2006.

DUSSE, L. M. S.; MACEDO, A. P.; BATSCHAUER, A. P. *et al.* Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Rev Bras anal Clin**, v. 40, n. 3, p. 193-197, 2008.

DZOBO, K.; THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A., *et al.* Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. **Stem Cells International**, ID 2495848, p.1-24, 2018.

EDUARDO, F de P.; BUENO, D. F.; de FREITAS, P. M., *et al.* Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 6, p. 433-438, 2008.

EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 6, p. 1502–1508, 2004.

ESLAMINEJAD, M. B.; VAHABI, S.; SHARIATI, M. *et al.* In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. **J Dent (Tehran)**, v. 7, n. 4, p. 185-195, 2010.

ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M. P., *et al.* Estudo da interação células Vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. **Matéria (Rio J.)**, v. 12, n. 1, p. 164-172, 2007.

FARLEY, A.; MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C. Cells, tissues, organs and systems. **Nurs Stand**, v. 26, n. 52, p. 40-45, 2012.

FERRER, D. M. P.; SOUSA, E. B.; MOURÃO, L. C., *et al.* Contribuição dos telômeros e da telomerase no surgimento de neoplasias e no processo de envelhecimento. **Rev. Interd. Ciên. Saúde**, v. 4, n.2, p. 89-99, 2017.

FONTANA, V. Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica. 2009.128 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FOOK, A. C. B. M.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para restauração óssea. **Matéria**, v. 15, n. 3, p. 392-399, 2010.

FORTIER, L. A.; BARKER, J. U.; STRAUSS, E. J., *et al.* The role of growth factors in cartilage repair. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 10, p. 2706-2715. 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialid applications**. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010, 732 p.

GAISSMAIER, C.; KOH, J. L.; WEISE, K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. **Injury**, v. 39, p. 88–96, 2008.

GARIKIPATI, V.; SHOJA-TAHERI, F.; DAVIS, M. E., *et al.* extracellular vesicles and the application of system biology and computational modeling in cardiac repair. **Circulation research**, v. 123, n.2, p. 188–204, 2018.

GOMES, M. F.; ABREU, P. P.; MOROSOLLI, A. R. C., *et al.* Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. **Braz oral res**, v. 20, n. 4, p. 324-330, 2006.

GRANGE, C.; TAPPARO, M.; BRUNO, S., *et al.* Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. International. **Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 5, p. 1055 - 1063, 2014.

GRAZIANI, F.; IVANOVSKI, S.; CEI, S., *et al.* The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. **Clin Oral Impl Res**, v. 17, n. 2, p. 212-219, 2006.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

GUO, W.; HE, Y.; ZHANG, X.; *et al.* The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. **Biomaterials**, v. 30, n. 35, p. 6708–6723, 2009.

HAYMAN, E. G.; PIERSCHBACHER, M. D.; SUZUKI, S., *et al.* Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. **Exp Cell Res**, v. 160, n. 2, p. 245-258, 1985.

HOWARD, D.; BUTTERY, L. D.; SHAKESHEFF, K. M., *et al.* Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. **Journal of Anatomy**, v. 213, n. 1, p. 66–72, 2008.

HUANG, G. T.; SHAGRAMANOVA, K.; CHAN, S. W. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. **J Endod**, v. 32, n. 11, p. 1066-1073, 2006.

HWANG, D. L.; LATUS, L. J.; LEV-RAN, A. Effects of platelet-contained growth factors (PDGF, EGF, IGF-I, and TGF-beta) on DNA synthesis in porcine aortic smooth muscle cells in culture. **Exp Cell Res**, v. 200, n. 2, p. 358-360, 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. **ISSO 10993-5**. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 2009. 24p.

JANG, J. H.; LEE, H. W.; CHO, K. M., *et al.* In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. **Restor Dent Endod**, v. 41, n. 4, p. 283-295, 2016.

JESUS, A. A.; SOARES, M. B. P.; SOARES, A. P. *et al.* Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: Technique and clinical case report. **Dental Press J Orthod**, v. 16, n. 6, p. 111–118, 2011.

JIAO, L.; XIE, L.; YANG, B., *et al.* Cryopreserved dentin matrix as a scaffold material for dentin-pulp tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 18, p. 4929-4939, 2014.

KATTIMANI, V. S.; KONDAKA, S.; LINGAMANENI, K. P. Hydroxyapatite - Past, Present, and Future in Bone Regeneration. **Bone and Tissue Regeneration Insights**, v. 7, p 9-19, 2016.

KAUR, G. & DUFOUR, J. M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2012.

KARAMZADEH, R.; ESLAMINEJAD, M. B.; AFLATOONIAN, R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. **Journal of Visualized Experiments**, v. 69, p. 1-10, 2012.

KAWASHIMA, N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 11 p. 1439-1458, 2012.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 18, n. 2, p. 129–138, 2012.

KIM, J.; UCHIYAMA, T.; CARRILHO, M., *et al.* Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. **Dent Mater**, v. 26, n. 8, p. 771-778, 2010.

KIM, Y-K.; CHOI, Y-H. Tooth Autotransplantation with Autogenous Tooth- Bone Graft: A Case Repor. **J Kor Dent Sci**, v. 4, n. 2. p. 79–84, 2011.

KIM, Y-K.; LEE, J.; UM, I. W., *et al.* Tooth-derived bone graft material. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n.3, p.103–111, 2013.

KIM, K. T.; EO, M. Y.; NGUYEN, T. T. H., *et al.* General review of titanium toxicity. **Int J Implant Dent**, v. 5, n. 10, 2019.

KOUSKOURA, T.; FRAGOU, N.; ALEXIOU, M., *et al.* The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v. 121, n. 7-8, p. 636-646, 2011.

KOYAMA, N.; MIURA, M.; NAKAO, K., *et al.* Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 1, p.102-113, 2012.

LA NOCE, M.; PAINO, F.; SPINA, A., *et al.* Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. **J Dent**, v. 42, n. 7, p. 761-768, 2014.

LEE, S. J.; ATALA, A.; YOO, J.; **In Situ Tissue Regeneration. Host Cell Recruitment and Biomaterial Design**. 1 ed. Academic Press, 2016. 458 p.

LI, R.; GUO, W.; YANG, B.; *et al.* Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 32, 2011.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical Reports**, v. 3, v. 5, p. 617–620, 2015.

LI, W.; CHEN, L.; CHEN, Z., *et al.* Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 300, p. 1-18, 2017.

LINDE A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. Session II: Cells and Extracellular Matrices of the Dental Pulp. **Journal of Dental Research**, v. 64, n. 4, p. 523–529, 1985.

LIU, Y.; YAO, X.; LIU, Y. W., *et al.* A Fourier transform infrared spectroscopy analysis of carious dentin from transparent zone to normal zone. **Caries Res**, v. 48, n. 4, p. 320-329, 2014.

LOMBELLO, C. B.; MALMONGE, S. M.; WADA, M. L. F. PolyHEMA and polyHEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing cells. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 11, p. 541-546, 2000.

LOS, M.; HUDECKI, A.; WIECHEC, E. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine. 1 ed. **Academic Press**, 2018, 249 p.

MAFRA, R. P.; VASCONCELOS, R. G.; VASCONCELOS, M. G., *et al.* Desenvolvimento dental: aspectos morfogênicos e relações com as anomalias dentárias do desenvolvimento. **Rev Bras Odontol**, v. 69, n. 2, 2012.

MAHLA, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. **International Journal of Cell Biology**, 2016; 2016.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1267-1274, 2009.

MALAVAL, L.; WADE-GUÉYE, N. M.; BOUDIFFA, M., *et al.* Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1145–1153, 2008.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M., *et al.* Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 6, p. 638-46, 1998.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to suport its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

MASSON, A. O.; LOMBELLO, C. B. **Estudo comparativo de ensaios de citotoxicidade aplicados à biomateriais: metodologias e condições de ensaio**. 2016. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, 2016.

MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 446-454, 2008.

MCDUFFEE, L. A. Comparison of isolation and expansion techniques for equine osteogenic progenitor cells from periosteal tissue. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 91–98, 2012.

MERCAN, U.; SÜMER, M.; SEMIRGEN, S. U., *et al.* Effects of dentin graft on bone mineral density of newly formed bone: an experimental animal study. **Cukurova Med J**, v. 43, n. 4, p. 876-885. 2018.

MINETTI, E.; BERARDINI, M.; TRISI, P. A New Tooth Processing Apparatus Allowing to Obtain Dentin Grafts for Bone Augmentation: The Tooth Transformer. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, p. 6-14, 2019.

MOHARAMZADEH, K.; FREEMAN, C.; BLACKWOOD, K. Processed bovine dentine as a bone substitute. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.46, n. 2, p.110–113, 2008.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009. v. 2.

MONTERUBBIANESI, R.; BENCUN, M.; PAGELLA, P. *et al.* A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. **Sci Rep** 9, n. 1761, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, v. 65, p. 55-63. 1983.

MURATA, M.; SATO, D.; HINO, J., *et al.* Acid-insoluble human dentin as carrier material for recombinant human BMP-2. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 3, p. 571-577, 2012.

NEUNZEHN, J.; PÖTSCHKE, S.; HANNIG, C., *et al.* Odontoblast-like differentiation and mineral formation of pulpsphere derived cells on human root canal dentin in vitro. **Head Face Med**, v.13, n.23, p. 1-10, 2017.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. **Cell J**, v. 13, n.4, p. 203–212, 2012.

NYMAN, J. S.; LING, H.; DONG, X., *et al.* Differences in the mechanical behavior of cortical bone between compression and tension when subjected to progressive loading. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 2, n. 6, p. 613-619, 2008.

OKESON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 512 p.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRE, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials today**, v. 14, p. 88-95, 2011.

PARSONS, H. A. Telômeros, telomerase e câncer. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 5, n. 1, p. 54-59, 2003.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 283 p.

PERINI, S.; SILLA, L. M. R.; ANDRADE, F. M.. A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 30, n. 1, p. 47-53, 2008.

POTDAR, P. D; JETHMALANI, Y. D. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*, v. 7, n. 5, p. 839-851, 2015.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2018.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F., *et al.* **Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine**. 2 ed. Academic Press, 2012. 1573 p.

REBELLO, M. A. **Fundamentos da cultura de tecido e células animais**. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. 181 p.

REIS, C. M. Aplicação da microscopia digital na quantificação do efeito de quelantes em dentina. 2006. 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

RIZZATTI, V.; BOSCHI, F.; PEDROTTI, M. *et al.* Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution. **European journal of histochemistry**, v. 57, n. 3, p. 159 - 162, 2013.

ROBERTS-CLARK, D. J.; SMITH, A. J. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 11, p. 1013-1016, 2000.

ROBEY, P.G. Stem cells near the century mark. **J Clin Invest**, v. 105, n. 11, p. 1489-1491, 2000.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R., *et al.* Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, v. 2015, 821279, 2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I., *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SANTOS, A. A.; MIRANDA, C. D. O.; ALVES, M. T. S., *et al.* O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta ortop bras**, v. 13, n. 4, p. 194-195, 2005.

SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SARI, D. S.; MADURATNA, E.; FERDIANSYAH, F., *et al.* Osteogenic differentiation and biocompatibility of bovine teeth scaffold with rat adipose-derived mesenchymal stem cells. **European journal of dentistry**, v. 13, n. 2, p. 206–212, 2019.

- SHIDFAR, S. H.; SEMYARI, H.; KHOSHZABAN, A., *et al.* Autogenous dentin as a bone substitute: A review. **Annals of Dental Specialty**, v. 6, n. 3, p. 333–337, 2018.
- SIMPSON, R. J. Fragmentation of protein using trypsin. *CSH Protoc*, v. 2006, n. 5, 2006.
- SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A., *et al.* Células-tronco em Odontologia. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D. J.; MENDEZ-BOLAINA, E.; TREJO-BAHENA, N. I. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. **Int J Pept**, v. 2012, 2012.
- SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S. W., *et al.* Células-tronco mesenquimais: células ideais para a restauração cardíaca? **Rev Bras Cardiol Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344-353, 2010.
- SPATH, L.; ROTILIO, V.; ALESSANDRINI, M., *et al.* Explant-derived human dental pulp stem cells enhance. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 6B, p. 1635–1644, 2010.
- SUKARAWAN, W.; OSATHANON, T. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: biology and therapeutic potential, mesenchymal stem cells - isolation, characterization and applications, Phuc Van Pham, **IntechOpen**, 2017.
- SUNG, E. K.; YOUNG-PIL, Y., DEOK-WON, L., *et al.* Alendronate-Eluting Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Scaffolds Stimulate Osteogenic Differentiation. **BioMed Research International**, v. 2015, ID 320713, p. 1 - 10, 2015.
- TABATABAEI, F. S.; TATARI, S.; SAMADI, R., *et al.* Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: A systematic review. **J Biomed Mater Res A**, v. 104, n. 10, p. 2616-2627, 2016a.
- TABATABAEI, F. S.; TATARI, S.; SAMADI, R., *et al.* Surface characterization and biological properties of regular dentin, demineralized dentin, and deproteinized dentin. **J Mater Sci Mater Med**, v. 11, n. 164, p. 1-11, 2016b.
- TOGARI, K.; MIYAZAWA, K.; YAGIHASHI, K., *et al.* Bone Regeneration by Demineralized Dentin Matrix in Skull Defects of Rats. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2011.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano. Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 704 p.
- TRAN, H. L. B.; NGUYEN, M. T. N.; DOAN, V. N. Fabrication and evaluation of human dentin as scaffold for dental pulp stem cells. **Tissue Eng Regen Med**, v. 12, n. 4, p. 222-230, 2015.
- ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Biosci Rep**, v. 35, n. 2, p. 1-18, 2015.
- UM, I. W.; KIM, Y. K.; MITSUGI, M. Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. **J Indian Prosthodont Soc**, v.17, n.2, p.120-127, 2017.

UM, I. W. Demineralized Dentin Matrix (DDM) As a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins (rhBMP-2). **Adv Exp Med Biol**, v. 1077, p. 487-499, 2018.

VAGASKÁ, B.; BACÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E., *et al.* Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. **Physiol Res**, v. 59, n. 3, p.309-322, 2010.

VEERABHADRAPPA, S. K.; CHANDRAPPA, P. R.; ROODMAL, S. Y., *et al.* Karyotyping: Current perspectives in diagnosis of chromosomal disorders. **Sifa Medical Journal**, v. 3, n. 2, p. 35 – 40, 2016.

VERMA, K.; BAINS, R.; BAINS, V. K., *et al.* Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 11, n. 3, p. 302-308, 2014.

VERT, M.; LI, S. M.; SPENLEHAUER, G., *et al.* Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 3, p. 432-446, 1992.

WANG, J. S. Basic fibroblastic growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. **Acta Orthop Scand Suppl**, v. 269, p. 1-33, 1996.

WANG, X.; SHA, X. J.; LI, G. H., *et al.* Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 9, p. 1231-1240, 2012.

WHITE, J. M.; GOODIS, H. E.; MARSHALL, S. J., *et al.* Sterilization of teeth by gamma radiation. **J Dent Res**, v. 73, n. 9, p. 1560-1567, 1994.

XIAO, W.; HU, C.; CHU, C., *et al.* Autogenous dentin shell grafts versus bone shell grafts for alveolar ridge reconstruction: A novel technique with preliminary results of a prospective clinical study. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 39, n.6, p.885–893, 2019.

YAGIHASHI, K.; MIYAZAWA, K.; TOGARI, K., *et al.* Demineralized dentin matrix acts as a scaffold for repair of articular cartilage defects. **Calcif Tissue Int**, v. 84, n. 3, p. 210-220, 2009.

YANG, B.; CHEN, G.; LI, J., *et al.* Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix - based scaffold. **Biomaterials**, v. 33, p. 2449-2461, 2012.

YANG, Y-H. K.; OGANDO, C. R.; SEE, C. W., *et al.* Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging *in vitro*. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 131, p. 1-14, 2018.

ZEZELL, D. M.; BENETTI, C.; VELOSO, M. N., *et al.* FTIR Spectroscopy Revealing the Effects of Laser and Ionizing Radiation on Biological Hard Tissues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2571-2582, 2015.

ZHANG, X.; REAGAN, M. R.; KAPLAN, D. L. Electrospun Silk Biomaterial scaffolds for Regenerative Medicine. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 61, n. 12, p. 988–1006, 2009.

ZHANG, Y. R.; DU, W.; ZHOU, X. D., *et al.* Review of research on the mechanical properties of the human tooth. **Int J Oral Sci**, v. 6, n. 2, p. 61-69, 2014.

ZULIANI, C. C.; BOMBINI, M. F.; ANDRADE, K. C., *et al.* Micromass cultures are effective for differentiation of human amniotic fluid stem cells into chondrocytes. **Clinics**, v. 73, e268, p. 1-8, 2018.