

LUCIANA APARECIDA DE SOUSA IWAMOTO

**A DESMINERALIZAÇÃO / DESCELULARIZAÇÃO
DENTÁRIA NA CONFECÇÃO DE *SCAFFOLD*
NATURAL.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde**

**SÃO PAULO
2015**

LUCIANA APARECIDA DE SOUSA IWAMOTO

**A DESMINERALIZAÇÃO / DESCELULARIZAÇÃO
DENTÁRIA NA CONFECÇÃO DE *SCAFFOLD*
NATURAL.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde.**

ORIENTADOR: Prof. Silvio Eduardo Duailibi

COORIENTADORA: Profa. Monica Talarico Duailibi

**SÃO PAULO
2015**

Iwamoto, Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto.

A desmineralização/ descelularização dentária na confecção de *scaffold* natural. / Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto.-- São Paulo, 2015.

xix, 118f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Translacional.

Titulo em inglês: Demineralization/ decellularization for natural teeth scaffold.

1. Engenharia tecidual. 2. Medicina Regenerativa 3.Desmineralização

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL

COORDENADOR: PROF.DR. MIGUEL SABINO NETO

Dedico minha dissertação, meus estudos e minha vida à minha família e a
Deus.

ELE que tem sempre um proposito em minha vida.

Ao meu querido Pai, ANTONIO ROCHA DE SOUSA, que me proporcionou o estudo, e deu condições para que eu conseguisse me formar e me tornar a pessoa que sou hoje, com seu exemplo de retidão, honestidade e caráter.

À minha maravilhosa Mãe, APARECIDA DE JESUS RUIZ DE SOUSA, que está sempre do meu lado me incentivando, e com sua maneira simples, humana e sábia de ver a vida, me aconselhando com suas palavras lindas de esperança e amor.

À minha irmã, VIVIANE RUIZ DE SOUSA, que sabe o quanto tudo isto significa para nós, ao principal motivo, minha pequena MILENA RUIZ DE SOUSA.

Ao meu Marido amado, GERSON YOSHINOBU IWAMOTO, que está sempre comigo me ajudando com suas criticas construtivas, companheiro e amigo.

Às minhas Filhas, BEATRIZ SOUSA IWAMOTO e GABRIELLE SOUSA IWAMOTO, que suportaram minha ausência durante estes anos de pesquisa, sem apresentarem nenhuma queda no desenvolvimento escolar.

À toda equipe do laboratório de Engenharia tecidual e Biofabricação do CTCMOL, a RANI CUNHA MORETTI, PAULO OLIVEIRA MARTINS, NELSON ROSSI, PAULO CÉSAR SIMÕES SILVA E ALINE SIPRINI DE SOUZA.

Às secretárias do nosso Programa de Pós graduação MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS, pela seriedade e compromisso no atendimento e apoio a todos os pós-graduandos.

Às minhas secretárias RUBERVÂNIA ALVES BATISTA, ANDREIA DE CASSIA CHIARI e ELIENE FERREIRA DO AMARAL por me ajudar no consultório e em casa nos momentos de ausência.

Ao PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL pela grande contribuição na minha formação.

À todos que acreditaram e contribuíram para esta conquista.

Ao meu orientador PROF. SILVIO EDUARDO DUAILIBI, coordenador do Laboratório de Engenharia tecidual e Biofabricação, que me trouxe para este Universo de pesquisa que mesmo sem me sentir preparada me incentivou, motivou e cobrou por melhora e progresso com seus conhecimentos científicos e intelectuais.

À minha coorientadora PROF. MONICA TALARICO DUAILIBI, que com muita dedicação desempenha sua função brilhantemente, além de ser uma Mãe exemplar.

Ao querido Prof. DR FRANCISCO ANDRÉ OSSAMU TANAKA, responsável pelo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP-MEPA), na ESALQ-USP, com seu conhecimento, objetividade na obtenção das imagens em MEV, por ter oferecido suporte técnico e científico, durante as etapas deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

À **GERSON YOSHINOBU IWAMOTO**, que está sempre comigo me ajudando com suas críticas pertinentes no desenho do projeto, realizou junto comigo o curso de microscopia eletrônica de Varredura, em Piracicaba, e auxiliou na estatística juntamente com o Ao **PROF. NEIL FERREIRA NOVO** e **PROFA. IARA JULIANO**, o meu muito obrigado.

À **BEATRIZ SOUSA IWAMOTO** e **GABRIELLE SOUSA IWAMOTO** que estiveram comigo durante férias escolares dentro da USP em Piracicaba, para adquirirmos juntas as imagens necessárias dos dentes descelularizados.

APARECIDA DE JESUS RUIZ DE SOUSA, que me transportou até a radiológica para tomada as imagens radiográficas digitais, e me emprestou seu carro inúmeras vezes.

À **PROF. DRA. LYDIA MASSAKO FERREIRA**, Titular da Disciplina de Cirurgia Translacional da UNIFESP, pela oportunidade de estar aqui, junto a estes profissionais que admiro e respeito.

Ao **PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**, coordenador do Programa de Pós Graduação em cirurgia translacional, pelo apoio e incentivo aos docentes e alunos.

Às minhas colegas de turma que foram essenciais para minha formação em especial **NATASHA MACHADO, RANI CUNHA MORETTI, JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS e VANESSA PENNA.**

A **RADIONORTH** que disponibilizou o aparelho de Rx, seus funcionários e o programa para captação de imagens digitais, sempre com boa vontade.

“A oportunidade é um bicho peludo na frente e pelado atrás.
Quando ela vem, é super fácil de pegar. Entretanto, quando ela passa
fica impossível agarrá-la.”

Dito popular

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
GLOSSÁRIO	xvi
RESUMO	xviii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	6
3. LITERATURA	8
4. MÉTODOS	23
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE 1	72
APÊNDICE 2	75
APÊNDICE 3	89
FONTES CONSULTADAS	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dentes do grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança da dentina no critério observado em microscopia eletrônica de varredura.....	36
Tabela 2 - Dentes dos grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança presença de polpa no critério de microscopia eletrônica de varredura.....	36
Tabela 3 - Dentes do grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança do cimento no critério de microscopia eletrônica de varredura	37
Tabela 4 - Dentes dos grupos controle 1 e experimentais 2, 3, 4, 5 segundo a semelhança de esmalte no critério de microscopia eletrônica de varredura.	38
Tabela 5 - Dentes dos grupos controle 1 e experimentais 2, 3, 4, 5 segundo alteração de coloração	38
Tabela 6 - Presença de trinca no cimento nas amostras	39
Tabela 7 - Medidas semanais da perda de massa durante o período de estudo.	75
Tabela 8 - Referente ao delta percentual das massas com relação as semanas	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma.....	26
Figura 2 - Dispositivo para tomada de radiografia	27
Figura 3 - Escalímetro	28
Figura 4 - Dentes seccionados longitudinalmente após receberem ouro coloidal, antes de serem observados em MEV	29
Figura 5 - Metalizador de amostras.....	29
Figura 6 - Gráfico da perda de massa semanal em gramas (*).....	33
Figura 7 - Delta percentual quanto a perda de massa (*).....	34
Figura 8 - Alterações observadas MEV (*)	35
Figura 9- Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 1	40
Figura 10 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 2	41
Figura 11 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 3	42
Figura 12 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 4	43
Figura 13 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 5	44
Figura 14 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 1	45
Figura 15 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 2.	46

Figura 16 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 3	47
Figura 17 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 4	48
Figura 18 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 5	49
Figura 19 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo 1(1-10) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	78
Figura 20 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura no grupo 2 (11-20), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	80
Figura 21 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura no grupo 3 (21-30), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.....	83
Figura 22 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura no grupo 4 (31-40), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.....	85
Figura 23 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura no grupo 5 (41-50), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- bar - unidade de pressão
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CH₂O – Formol
- cm - centímetros
- CTCMol - Centro de Terapia Celular e Molecular
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- EA - ácido etidrônico
- EDTA- Etilenodiaminotetracetato de tetrasódio
- EGF - Fator de crescimento epidérmico
- EGFR – Receptor de fator de crescimento
- ET - Engenharia Tecidual
- HA - hidroxiapatita
- g - gramas
- HCl - Ácido Clorídrico
- H₂O₂ . Peróxido de hidrogênio
- MEC – Matriz Extra Celular
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MMPs - metaloproteinase
- MSCs - células mesenquimais
- MR- Medicina Regenerativa
- NaOCl - hipoclorito de sódio
- mM- milimol (milésimo de molécula)
- nm – nanômetros
- PA - ácido peracético

PBS- Tampão Fosfato

RNA – Ácido ribonucléico

SEM - Microscópio de Elétron Exploração

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TyrPC - tirosina biomimética de policarbonato

UV - Ultra Violeta

% - Porcentagem

(*) – Significância estatística

GLOSSÁRIO

Paraplast® - marcador imunohistoquímico

Riozyme® neutro gold - detergente enzimático, é um detergente à base de enzimas utilizado em operações de limpeza, removendo resíduos orgânicos em equipamentos, artigos e instrumentos médico hospitalares, odontológicos e laboratoriais. Recomenda-se 5ml para 1 litro de água (fonte: www.rioquimica.com.br)

SCAFFOLD - Substrato à base de biomateriais para utilização em Regeneração Tecidual com habilidade para comportar atividades celulares, farmacos, genes... Suporte – Andaime – material biocompatível, reabsorvível ou não. Utilizado para regenerar tecidos ou organizar células. Auxiliar as células na confecção de sua nova matriz extracelular. Três tipos básicos: sólido, fibra e gel.

SMEAR LAYER – A camada de lama dentinária produzida após o preparo de cavidades com instrumentos rotatórios interfere na permeabilidade dentinária e conseqüentemente na adesão de materiais restauradores.

RESUMO

RESUMO

Introdução: A Engenharia Tecidual (ET) é uma ciência multidisciplinar que visa produzir órgãos e partes humanas substitutas acometidas por lesões traumáticas, doenças degenerativas ou agenesias. Uma das suas etapas é a produção de arcabouços biocompatíveis para aplicação na Medicina Regenerativa. Estas estruturas são conhecidas como *scaffolds*, que apresentam macrogeometria semelhante ao tecido original, em textura e porosidade e direcionam o comportamento das células que serão semeadas. A recuperação da integridade anatômica e funcional de tecidos lesados garante a sobrevivência dos seres vivos e o tratamento de perdas extensas é desafiador. Objetivo: Avaliar a eficiência para desmineralizar e descelularizar dentes viabilizando-os como *scaffolds* naturais. Métodos: As amostras foram submetidas a um tratamento com soluções desmineralizadoras/descelularizadoras. Foram usadas 5 soluções: G1-Formol 10% controle, EDTA 28% para desmineralização nos quatro grupos; G2- hipoclorito de sódio 2,5%; e G3-peróxido de hidrogênio 9%; G4- hipoclorito de sódio 2,5% associado com detergente enzimático; G5- detergente enzimático associado a peróxido de hidrogênio 9%. A evolução da desmineralização e descelularização foi acompanhada durante 12 semanas, por meio de pesagem, técnicas analíticas MEV (Microscopia eletrônica de Varredura), fotografia e radiografia. As amostras foram pesadas a cada sete dias para controle da perda de mineral. Os resultados receberam análise estatística de variância de Friedman, Kruskal-Wallis,

Teste do Quiquadrado e Teste exato de Fisher. Foi fixado em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Conclusão: O grupo 5 mostrou-se microscopicamente a melhor solução, mesmo mantendo em 30% das amostras resíduos biológicos.

Palavras chave: Medicina Regenerativa, Engenharia Tecidual, Desmineralização.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A reposição das perdas dentais sempre foi um grande desafio na odontologia, sendo que a busca por um substituto biológico vislumbra novos horizontes terapêuticos. (Duailibi et al,2004)

Engenharia Tecidual (ET) é um campo de estudo que abrange diversas áreas do conhecimento, e em maior intensidade nas áreas médica, biológica e da engenharia. O uso de um substituto biológico para o restabelecimento do equilíbrio funcional pode apresentar maior compatibilidade com o organismo.

O substituto ideal é de origem autóloga, por não apresentar reação imunológica. (VACANTI, 1993, MOONEY, 2001, DUAILIBI et al., 2004, DUAILIBI et al., 2006, DUAILIBI et al., 2008, DUAILIBI et al., 2011).

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais semelhante ao tecido original, em textura macro e micro-geometria favorecendo a adesão celular e sua consequente expressão. O uso de *scaffolds* poliméricos para cultura de células de germes dentários representa uma proposta da ET. (DUAILIBI et al., 2004, DUAILIBI et al., 2006, DUAILIBI et al., 2008, DUAILIBI et al.,2011).

A descelularização de órgãos e tecidos é bastante utilizada em ET. A eficiência na remoção de restos celulares, depende da origem do tecido e dos métodos físicos, enzimáticos, e químicos utilizados. As condições ideais para o uso destes tecidos incluem a mínima interferência na composição bioquímica, ultraestrutura do tecido e o comportamento mecânico da matriz extra celular (MEC). (GILBERT et al., 2006)

O uso de *scaffolds* biológicos provenientes da descclularização de tecidos e órgãos surgiu como uma alternativa para evitar a reação imunológica do leito receptor frente a um corpo estranho. Geralmente os componentes da MEC são conservados nos indivíduos da mesma espécie e, por isso são bem tolerados pelos receptores xenogênicos (BERNARD et al., 1993).

Os métodos enzimáticos iniciam-se através de lise da membrana celular, seguido da separação de componentes da MEC. A solubilização de estruturas citoplasmáticas e nucleares é realizada com detergentes que removem os restos celulares. Após a descclularização, todos os produtos químicos residuais devem ser removidos, a fim de evitar uma resposta inflamatória do hospedeiro (GILBERT et al., 2006). As propriedades destes detergentes devem ser relativamente suaves no tecido e a conformidade funcional destes detergentes justificam a sua aplicação (HUDSON et al., 2004; WOODS & GRATZER 2005).

Agentes quelantes como Etilenodiaminotetracetato de tetrasódio (EDTA) facilitam a remoção do material celular do tecido, e podem ser aplicado associado à tripsina (GILBERT et al., 2006). Um levantamento bibliográfico produzido por NEVES et al. (2011) aponta o EDTA como a melhor opção para desmineralização.

Junqueira & Carneiro (2004) afirmam que a principal função dos fixadores é insolubilizar as proteínas dos tecidos através de ligações cruzadas entre os aminoácidos, o que é de fundamental importância na fixação, pois são essas proteínas as responsáveis pela manutenção estrutural das células e tecidos. Um dos principais fixadores para trabalhos de rotina em microscopia óptica é o formaldeído a 4% em solução tamponada, que equivale à solução aquosa de formalina a 10%.

O hipoclorito de sódio é um composto halogenado usado na Odontologia, durante o tratamento endodôntico, para desinfetar o canal e dissolver qualquer resto de tecido da polpa do dente. Esta solução, como substância química auxiliar no preparo químico-mecânico de canais radiculares tem sido amplamente empregada pelos endodontistas. O uso desta solução para irrigação deve-se às suas excelentes propriedades tais como: capacidade de dissolver tecidos orgânicos, antimicrobiana, pH alcalino, desodorizante, baixa tensão superficial e promover clareamento. Todavia, a solução utilizada deve estar dentro dos padrões químicos aceitáveis para que suas funções sejam desempenhadas e alcançar o objetivo desejado. (BORINA et al., 2007)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um potente agente oxidante que libera oxigênio nascente e é utilizado há várias décadas. Com alta concentração, essa solução é utilizada como agente clareador. O peróxido de hidrogênio, quando em contato com sangue produz reação efervescente, liberando oxigênio nascente produzindo hemólise e hemoglobinolise, removendo detritos do interior do canal radicular. Como agente oxidante evita que o sangue penetre nos canalículos dentinários e altere a cor dos dentes (BRANCINI et al., 1983).

Muitos são os mecanismos de desmineralizar e descelularizar os órgãos, mas ainda não há um processo definitivo para o órgão dentário. Uma vez que na odontologia tem por objetivo alcançar não somente a restauração do dente mas sua regeneração, há necessidade de avançar nos estudos para mimetizar o órgão e utiliza-lo como *scaffold* natural.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a eficiência de métodos para desmineralizar e descelularizar dentes viabilizando-os como *scaffolds* naturais.

LITERATURA

3. LITERATURA

EMANS *et al.* (2005), estudando os efeitos de diferentes protocolos de descalcificação de cartilagens com marcadores em geral, mencionou que a apoptose é caracterizada por rupturas da costa do DNA. A digestão da proteinase K é pensada para ser uma etapa essencial no procedimento. Os efeitos de descalcificação, para secções de cartilagem, são desconhecidos pela maioria. Os efeitos destes reagentes na retenção e na integridade do DNA dos condrócitos não foram descritos. Mas avaliaram os efeitos de várias soluções descalcificantes incluindo o EDTA de 10%, o ácido cítrico de 10%, o ácido tricloroacético de 5%, o ácido acético de 5% e um reagente ácido-base hidrocloreto comercial, para marcar toda a cartilagem e realizar a análise. Os efeitos da proteinase K na preservação do núcleo foram examinados também. A descalcificação com EDTA de 10% deu o melhor resultado. O DNA de Condrócitos era retido e intacto após ter usado este reagente. A descalcificação com EDTA de 10% é o método mais seguro de descalcificação se a análise de TUNEL for aplicado à cartilagem. A digestão da Proteinase K pode ter efeitos adversos na preservação do núcleo na cartilagem.

GILBERT *et al.*(2006), relatam que os tecidos e os órgãos descelularizados tem sido usados com sucesso em Engenharia Tecidual e em Medicina Regenerativa. Os métodos de descelularização usados variam muito de acordo com os tecidos e os órgãos. A eficiência da remoção das células de um tecido depende da origem deste tecido e da maneira que serão utilizados os processos químicos e enzimáticos. Cada um destes tratamentos afetam a composição bioquímica, ultraestrutura do tecido, e comportamento mecânico do scaffold e da matriz extra celular (MEC), que por sua vez, afetaram a resposta do hospedeiro frente a este material. O objetivo de um protocolo de descelularização é remover eficientemente todo o material celular e nuclear, além de minimizar todo o efeito adverso

na composição, na atividade biológica, e na integridade mecânica da MEC restante.

Todas as etapas do processo removem células, e isso altera a arquitetura tridimensional nativa da MEC. Os tecidos são compostos por material celular e da MEC arranjados em graus variáveis de compactabilidade, dependendo da fonte do tecido. A MEC deve, adequadamente, se romper durante o processo de descelularização para permitir a exposição adequada de todas as células aos agentes e para fornecer um trajeto para que o material celular seja removido do tecido. A intenção da maioria dos processos de descelularização é minimizar o rompimento e reter assim propriedades mecânicas nativas e propriedades biológicas.

WANG *et al.* (2007), com o objetivo de estudar os métodos de descalcificação para fazer com que o dente e os tecidos periodontais se tornem fatias estruturalmente unidas, estudou vinte e uma amostras que contêm os molares de um cão e tecidos periodontais, os mesmos foram divididos em sete grupos médios. O valor de pH da solução, o tempo da descalcificação, o peso e o volume das amostras, e do índice do cálcio descalcificado foram detectados. As fatias eram observadas e marcadas imuno histoquimicamente. Como resultado a velocidade de descalcificação aumentou com diminuição do pH da solução. O grupo com descalcificação por EDTA era o mais lento, mas era o melhor para manter a forma. Por fim concluiu que a solução do formol de 50% que contém o cloreto de alumínio é uma solução descalcificante mais rápida ideal para processos rápidos, mas deve-se ter cautela pois há perda de forma.

BAPTISTA *et al.* (2008) É estimado que mais de 21 milhões de pessoas no mundo vivem com doença hepática crônica, e cerca de 800.000 morrem anualmente, de acordo com a OMS. No entanto, a diferença entre doação de órgãos e o número de pacientes em lista de espera por um fígado continua aumentando. A escassez de órgãos tem estimulado a pesquisa de alternativas na doença hepática em estágio final. Terapias celulares com

algum grau de sucesso são hoje uma realidade. Conseguiram criar um novo fígado acelular derivado de *bioscaffold* com a rede vascular preservado, que se forem recelularizado seu tecido e sua massa, exibiram funções hepáticas. Também foi transplantado com sucesso para hospedeiros vivos e perfundido com sangue. Em conclusão, demonstrou claramente a geração com sucesso do tecido do fígado 3D como um *bioscaffold* acelular de fígado, usando diferentes fontes de células. Isso representa potencialmente uma nova esperança para os pacientes que sofrem de doença hepática em estágio final. Devido à escassez de órgãos, novas alternativas têm sido investigadas na última década. Isto permitiu também gerar tecido 3D densamente recelularizado e com expressão de marcadores hepáticos característicos. Para melhorar a geração de tecido hepático, foi investigado o uso de células progenitoras humanas obtidas a partir de fígados fetais em combinação com a matriz acelular. A plasticidade exibida in vivo por essas células é notável e confirma o seu potencial em Medicina Regenerativa. Destacam a relevância de um novo método de descelularização de órgãos passível de gerar matrizes acelulares derivadas com preservação de uma rede vascular funcional.

PÉREZ *et al.*(2008) Para avaliar e comparar o efeito da descalcificação do EDTA de 15%, do ácido cítrico de 15%, do ácido fosfórico de 5% e do hipoclorito de sódio 2,5% na dentina do canal radicular. Cortou duas fatias milimétricas do terço coronal da raiz de 10 incisivos humanos. Cada fatia foi seccionada em duas porções iguais. Os espécimes foram atribuídos de quatro grupos (n = 10) para a imersão em 20 ml do EDTA, de ácido cítrico, de ácido fosfórico de 5% e a 2.5% NaOCl, por três períodos de tempo (5, 10 e 15 minutos). A concentração de CA (2+) extraída do dentina foi medida pelo espectrofotômetro de absorção atômico. A quantidade de cálcio extraída foi analisada usando o teste de Kruskal-Wallis para comparações globais e o U-teste de Mann-Whitney para comparações. E nos três períodos de tempo, o EDTA de 15% e o ácido cítrico de 15% extraíram a quantidade maior de cálcio, com nenhuma diferença significativa entre elas. A solução de 2.5% NaOCl extraiu quantidades insignificantes de cálcio, visto que o EDTA de 15% extraiu 86.72% do cálcio nos primeiros 5 minutos, e o ácido cítrico de 15% e o

ácido fosfórico de 5% tiveram um teste padrão similar da remoção do cálcio (77.03% e 67.08% em primeiros 5 minutos, respectivamente). E concluíram que as soluções do EDTA de 15%, do ácido cítrico de 15% e do ácido fosfórico de 5% causou a descalcificação a dentina, com a maior quantidade de cálcio extraído durante os primeiros 5 minutos da ação. A eficácia de soluções do ácido cítrico de 15% e do EDTA de 15% era significativamente maior do que a solução de ácido fosfórico de 5% .

LOTTANTI *et al.*(2009), avaliando o ácido etilenodiaminotetracetato de tetrasódio (EDTA), ácido etidrônico (EA) e ácido peracético (PA) e seus efeitos quando usado conjuntamente com o hipoclorito de sódio (NaOCl) como irrigantes do canal radicular dos dentes, presença de cálcio dos canais, smear layer e desmineralização desta dentina, após a instrumentação/irrigação endodôntica . Os pré-molares uniradicular humanos foram irrigados como segue (n = 12 por grupo): (1) 1% NaOCl durante a instrumentação, água deionizada após a instrumentação, (2) 1% NaOCl durante, EDTA de 17% após a instrumentação, (3) um 1: 1 mistura de 2% NaOCl e de 18% EDTA durante e após a instrumentação, e (4) 1% NaOCl durante, PA 2.25% após a instrumentação. Os volumes de irrigante e os tempos do contato eram 10 ml/15 minutos durante e 5 ml/3 minutos após a instrumentação. Os resultados foram avaliados por espectroscopia de absorção atômica, áreas com concentração de cálcio, smear layer fazendo a microscopia de varredura de elétron na modalidade secundária do elétron e de descalcificação aparente da parede do canal em transecção da raiz. Para a análise da dentina esclerosada foi feito exame na camada da mancha. Resultando na comparação estatística dos protocolos a respeito da diluição do cálcio, revelou que o protocolo (1) rendeu menos cálcio do que o (3), que rendeu menos do que os protocolos (2) e (4). A maioria das paredes instrumentadas do canal tratado com um dos agentes descalcificantes estavam livres da camada de smear layer. Protocolos (1) e (3) não causado nenhum descalcificação do dentina da raiz, apesar de (2) e (4) da substância mostrada testes padrões típicos da desmineralização. E concluíram que os agentes descalcificação sob a investigação podiam remover todo ou prevenir o smear layer . Entretanto, corroeram a parede da dentina diferentemente.

NAVARRO *et al.* (2010) Não havendo um substituto valvar ideal, os homo-enxertos crio-preservados são considerados uma boa opção, pelo excelente perfil hemodinâmico, baixa incidência de trombo-embolismo, resistência a infecções e durabilidade a médio prazo. Porém, estão sujeitos à progressiva degeneração, especialmente em crianças e adultos jovens. Sua antigenicidade desencadeia uma resposta imunológica, que contribui para sua degeneração, calcificação e falência. Para diminuir esta antigenicidade, desenvolveu-se o processo de descclularização. Pela ação de detergentes e enzimas, este processo remove os componentes celulares do homo-enxerto, diminuindo sua imunogenicidade e, provavelmente, retardando sua degeneração. O objetivo deste estudo, experimental e descritivo, foi analisar o comportamento histológico e funcional de homo-enxertos pulmonares ovinos descclularizados (H-desccl) por uma nova solução, composta principalmente de dodecil sulfato de sódio a 0,1% . Para caracterizar este comportamento, serão avaliados o repovoamento celular, a ocorrência de calcificação e a função valvar ao eco-cardiograma. As amostra foram constituídas de oito ovinos, submetidos ao implante de H-desccl em posição ortotópica, através de uma toracotomia esquerda, com auxílio de circulação extracorpórea. Os animais foram acompanhados clinicamente e por eco-cardiogramas periódicos até o explante, realizados em prazos predefinidos para cada dois animais: sete, 30, 90 e 180 dias. A análise histológica foi realizada por colorações Hematoxilina-eosina, Pentacrômio de Movat e Alizarina Red. Como resultado todos os animais sobreviveram ao procedimento e atingiram seus períodos de seguimento. Não houve insuficiência ou estenose destes enxertos ao ecocardiograma. Os animais submetidos aos explantes em 90 e 180 dias tiveram significativos ganhos ponderais e estes H-desccl aumentaram de diâmetro, sem desenvolver insuficiência. A análise histológica mostrou que todos mantiveram a organização de sua matriz extracelular, foram progressivamente repovoados e não apresentaram calcificação. Concluindo-se que neste modelo experimental, os H-desccl mostraram-se excelentes substitutos valvares a médio prazo.

ZACCARO *et al.* (2010), avaliando a biocompatibilidade de agentes quelantes e dos ácidos orgânicos neste estudo avaliou a resposta inflamatória do EDTA, EDTA-T, e do ácido cítrico no defeito ósseo criado nas maxilas de rato. Sendo que foram criados defeitos nas mandíbulas de 60 ratos, bilateralmente.. Um lado recebeu Fibrinol (controle), visto que o lateral oposto recebeu Fibrinol embebido com cada substância e foram avaliados no 1º, no 7º, no 14º, e no 28º dia (n=5 para cada dia). Hemi mandíbulas foram preparadas para o microscópio claro, e as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina. As imagens digitadas foram analisadas com um software morfométrico (Image J; Instituto nacional da saúde mental, Bethesda, MD). para obter o número de pilhas inflamatória por área. As comparações foram executadas usando o teste de Kruskal-Wallis (p=0.05). E os resultados obtidos durante todos os períodos o ácido cítrico e EDTA-T mostraram respectivamente, os números mais baixos e os mais elevados de pilhas inflamatórias por área. Todas as substâncias e controles testados mostraram a resposta inflamatória, a mais elevada foi a da pilha no 14º dia. E concluíram que entre as substâncias testadas, ácido cítrico provou ser a solução mais agressiva em 14 dias, mas em 28 dias, todas as soluções foram similares.

KATO *et al.* (2011), buscando alternativas para adquirir substituto de dentes humanos, estudou as metaloproteinase (MMPs) implicadas no metabolismo do colágeno nos processos fisiológicos e patológicos da dentina humana. E foram utilizados dentes bovinos como um substituto para os dentes humanos em análise laboratorial, que avaliou a atividade de MMP 2 e 9 nos dentes bovinos e humano. Os fragmentos da dentina de ambos, foram pulverizadas, para extração da proteína, sendo executado dois protocolos: uma solução neutra com guadinina-HCl/EDTA (pH 7.4) e uma solução ácida com ácido cítrico (pH 2.3). As atividades de Gelatinolítica das soluções foram reveladas pela Zimografia (técnica de eletroforese, com base em SDS-PAGE, que inclui um substrato copolimerizado com a poliacrilamida_gel, para a detecção de enzima de atividade). MMP2 e 9 foram detectados na coroa e na dentina da raiz dos dentes bovinos e de seres humanos. Concluiu-se que a dentina bovina pode ser um scaffold de confiança para os estudos que envolvem a atividade de MMP 2 e de 9.

NEVES *et al.* (2011), projetou a verificação da influência de três agentes desmineralizantes em EGF (Fator de crescimento epidérmico), EGF é um fator de crescimento que desempenha um papel importante na regulação do crescimento celular, proliferação e diferenciação através da ligação com o seu receptor EGFR. EGF humano é o 6045 - proteína com 53 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto intra-molecular, sendo que o EGFR possui uma boa imunocoloração na morfologia do tecido. Foram escolhidas as glândulas submandibulares que são uma fonte de EGF e seu receptor EGFR, para serem analisadas, usando um controle em cada etapa da descalcificação. Após o sacrifício dos ratos masculinos de Wistar adultos, pela fixação e perfusão, as glândulas submandibulares e as mandíbulas foram colocados nas seguintes soluções: (a) ácido nítrico de 5%, no formaldeído de 4%; (b) 4.13% EDTA pH 7.4; (c) ácido tricloroacético de 5%. As Mandíbulas serviram como um parâmetro por um tempo de descalcificação em cada solução desmineralização. Um grupo de controle foi executado com as glândulas submandibulares que não foram colocadas em nenhuma solução de desmineralização. Depois que as mandíbulas eram completamente descalcificadas, as glândulas foram processadas encaixando em Paraplast® e um marcador imunohistoquímico feito para detectar EGF e EGFR. Observou-se que a descalcificação não produziu diferenças visíveis nos termos do imunoreatividade de EGF e de EGFR, mas teve-se um efeito na qualidade da morfologia e de marcar. Nossos resultados indicam que não há nenhum problema nos tecidos que requerem a descalcificação e que o EDTA é a melhor escolha para o descalcificação nos casos que não são urgentes.

PROSECKÁ *et al.* (2011), otimizando as condições para células mesenquimais se diferenciarem em osteoblastos, no colágeno e na matriz de hidroxiapatita, estudaram scaffolds compostos por substratos de colágeno/ hidroxiapatita (HA), que são conhecidos por serem scaffolds apropriados para semear células mesenquimais (MSCs) e se diferenciarem em osteoblastos e serem utilizadas na produção *in vitro* dos ossos artificiais. Entretanto, a relação ótima de colágeno/HA não é clara, mas confirmou que um índice mais elevado do colágeno aumentou a rigidez do scaffold, e que uma rigidez maior não foi suficiente para a formação do

tecido ósseo, processo complexo que depende evidentemente da porosidade deste scaffold e do diâmetro do poro do scaffold . Em conclusão, o scaffold ótimo para a formação óssea e proliferação de novas células, foi encontrado em um scaffold composto por 50 WT % do HA de 0,5 % em solução do colágeno I .

GILLETE *et al.*(2011), estudando a MEC em 3D de múltiplos tecidos e suas variações micro estruturais podem direcionar comportamentos celulares diferentes. Embora o controle sobre a estrutura da MEC possa se mostrar útil em ET, nos estudos do comportamento celular, as matrizes 3D isotrópicas replicam mal estas variações em micro estruturas. Os resultados mostraram que, em tecidos multifase projetados, as estruturas de fibras do colágeno em ambas as fases do MEC poderiam ser moduladas variando as concentrações do colágeno e a temperatura do gel. Demonstrando como as estruturas da fibra do colágeno podem ser projetadas dentro de todas as regiões de um scaffold multifase do tecido, explorando o conhecimento do conjunto do colágeno, e apresenta uma aproximação à estrutura local do colágeno .

KIM *et al.* (2011), estudando o potencial de diferenciação osteogênica dos pré odontoblastos derivados da tirosina biomimética do scaffold de policarbonato (TyrPC) que contêm um ester etil ou o grupo do ester metil combinado com o osso humano foi avaliado usando as células do pré-osteoblasto. Cada composição de scaffolds porosos tridimensionais com uma distribuição bimodal do poro de 20 μ m e dos macro poros entre o 200 - 400 μ m. A caracterização do microscópio de elétron da exploração (SEM) sugeriu o acessório da células. Além disso, as correntes laterais suportaram a progressão osteogênica , a fosfatase alcalina (ALPES) e a expressão do osteocalcin (OCN) ,assim como um aumento no índice do cálcio comparado aos scaffolds que contêm o grupo do ester metil. Não havia nenhuma diferença significativa no bioatividade. Conseqüentemente, os dados sugerem fortemente que scaffolds de TyrPC pode fornecer uma plataforma altamente útil para a engenharia do tecido do osso.

GUPTE & MA (2011), analisando scaffolds de nanofibras para aplicações dentais e craniofaciais, as soluções da ET aproveitaram frequentemente materiais biomiméticos para suportar células para a regeneração funcional do tecido. Os scaffolds tridimensionais podem criar multifases e um ambiente capaz de facilitar a adesão, o proliferação, e a diferenciação da células. Este scaffold incorpora características nanofibras para imitar a matriz extracelular, junto com uma rede porosa para a regeneração de uma variedade dos tecidos. Portanto, a síntese de fabricação de scaffolds em nanofibras, seus efeitos biológicos, suas aplicações em ET óssea, cartilagem, esmalte, dentina, e periodonto, scaffolds paciente-específicos, e sistemas incorporados da entrega do fator do crescimento. Os scaffolds de Nanofibras não podem somente promover o campo da regeneração craniofacial mas também da tecnologia avançada para recolocações tecido-projetadas em muitos sistemas fisiológicos.

BICHARA *et al.* (2011), estudando a reconstrução, o reparo e a regeneração da estrutura auricular externa continuam a ser um dos maiores desafios no campo da ET. Para substituir, é necessário emular a estrutura e a composição nativas da cartilagem auricular combinando uma fonte de células condrogênicas apropriada com um scaffold sob condições ideais *in vitro*, para otimizar as condições *in vivo*. Devido ao fato que um substituto apropriado e de confiança para a cartilagem auricular deva ser projetado ainda, a cartilagem costal autóloga, deu forma a implantes porosos do polietileno em orelha, e é uma modalidade atual do tratamento para o reconstrução auricular. Entretanto, sobre a última década, avanços significativos foram feitos no campo da ET e da MR. Uma variedade de scaffolds e as aproximações inovativas foram investigadas como alternativas a usar o cartilagem costal autóloga ou implantes porosos de alta densidade de polietileno. Uma revisão de desenvolvimentos recentes, os últimos modelos e a ciência atual é apresentada, focalizando em scaffolds, fontes de células, semeando densidades, e características mecânicas da cartilagem auricular tecido-projetado.

ZHU *et al.* (2011), afirmaram que a determinação das propriedades mecânicas de um scaffold rígido é relativamente direta, enquanto testes mecânicos de um scaffold macio de tecido pode ser um desafio significativo devidos a sua fragilidade. Sugerem que para caracterizar o

módulo elástico de um scaffold e sua rigidez deva ser utilizada a microscopia de força atômica (MFA) com nano identificação. Um modelo matemático foi desenvolvido para verificar a rigidez e o módulos elástico de um scaffold de sua curva da força obtida sob circunstâncias diferentes. Além disso, a rigidez do scaffold depende significativamente da matriz extracelular onde são depositadas e semeadas as células que crescem e se diferenciam dentro do scaffold de acordo com esta estrutura.

MIRMALA *et al.*(2011), desenvolveu um trabalho focalizando a preparação de scaffolds com nanofibras de poliuretano que contêm o cloreto de cálcio (CaCl₂) preparado através do processo eletrospilin para as aplicações em bionanotecnologia. As caracterizações morfológicas, estruturais e as propriedades térmicas do poliuretano/nanofibras de CaCl₂ foram determinados usando o microscopia de elétron da exploração (SEM), o microscópio de elétron da exploração da campo-emissão (FE-SEM), o espectroscópio dispersivo de energia de raio X (EDX), o espectroscópio de Fourier (FT-IR) e o termo-gravimetria e infravermelhos (TGA). As imagens de SEM revelaram que estas nanofibras compostas possuem o sentido bem orientado e tiveram uma incorporação boa de CaCl₂. As características morfológicas das células unidas ao scaffold de poliuretano/nanofibras de CaCl₂ foi confirmada por SEM. A compatibilidade *in vitro* das células com este scaffold de poliuretano/nanofibras de CaCl₂ foi estudada, e demonstrou um efeito não-tóxicos para fixação das células.

GARLLER *et al.*(2011), estabelecendo uma estratégias para engenharia tecidual, a escolha de um scaffold apropriado é a primeira etapa e certamente crucial. Uma variedade de biomateriais estão disponíveis: polímeros naturais ou sintéticos, matriz extracelular, sistemas de montagem, hidro géis, ou biocerâmicas. Cada material oferece uma química, uma composição e uma estrutura, um perfil de degradação, e uma possibilidade original para a modificação. O papel do scaffold mudou do portador passivo para uma matriz bioativa, que pudesse induzir um comportamento celular desejado. As aproximações recentes para gerar a polpa dental confiam em materiais estabelecidos, tais como o colágeno, o poliéster, o quitosan, a hidroxiapatita. Os resultados após o transplante mostram a formação de um tecido frágil de conexão e a dentina

recentemente gerado. Para a engenharia dentina-polpa-complexa, os aspectos incluindo o vascularização, as interações da célula-matriz, a incorporação do fator de crescimento, a degradação da matriz, o mineralização, e o controle de contaminação devem ser considerados. O projeto racional da sequência dos peptídeos e hidrogel permite o controle da rigidez deste material, a indução do nucleação mineral, ou a introdução da atividade antibacteriana. As respostas celulares podem envolver pela incorporação de modificadores da adesão da célula, de locais enzima-cleavable, e de fatores apropriados do crescimento. A combinação de materiais indutivos do scaffold pode otimizar e as aproximações para a regeneração do complexo da dentina-polpa.

SAKAI *et al.* (2011), afirmaram que a polpa dental humana contém uma subpopulação pequena de células tronco que exibem um multipotencial, demonstrado por sua habilidade de diferenciar-se em odontoblastos, células neurais, e células endotelial-vasculares. Estas descobertas destacam o papel fundamental de células-tronco na biologia da polpa dental e sugerem que estas possam ser utilizadas em ET. Com o objetivo de descrever a utilização do dente como um modelo para ser utilizado como Scaffold e abrigar estas células multipotenciais e se aderirem neste arcabouço e poder assim se expressar e se diferenciar. A disponibilidade das aproximações experimentais projetadas, especificamente para estudos do potencial de diferenciação de células tronco dentais da polpa teve um papel importante nestas descobertas.

KAJBAFZADEH *et al.* (2013), a descclularização do cólon proporciona scaffold biológico tridimensional sem quaisquer elementos celulares e com preservação da matriz extracelular, a fim de permitir a semeadura de células autólogas para o aumento de tecido sem qualquer resposta imunológica. Este estudo foi realizado para investigar a segurança da viabilidade de cólon de ovelhas descclularizados como um primeiro passo de engenharia de tecido do cólon. O processo de descclularização de cólon de ovelhas foi realizado em quatro etapas que incluíram scaffold de preparação, exame histológico e investigações microscópicas, para revelar os depósitos celulares restantes, a avaliação biomecânica e estudos de

quantificação de colágeno através da medida do conteúdo de hidroxiprolina normal e das descelularizadas . Os scaffold do cólon de ovelha descelularizado revelou a remoção completa de células sob um microscópio de luz .Os resultados dos testes biomecânicos mostraram que a matriz extracelular descelularizadas não suportam quaisquer danos inesperados ou mudanças estruturais que a tornam incapaz de tolerar as forças in vivo e alongamentos . As imagens microscópicas capturadas após coloração do tecido com Picro-sirius vermelho, também mostraram que o colágeno na matriz extracelular é bem preservado, o que foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura. Isto implica que o scaffold preparado por este método é adequado para o aumento de tecido ou transplantes.

BURK *et al.* (2013), o uso de tecido do tendão descelularizados como scaffold para a engenharia tecidual, oferece grandes oportunidades para futuras aplicações clínicas e de pesquisa atual. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento e dois detergentes diferentes, t-octil-phenoxypolyethoxyethanol (Triton X -100) e dodecil sulfato de sódio (SDS), sobre a eficácia descelularização e citocompatibilidade, sendo avaliada com base na redução da contagem de células vitais, núcleos histologicamente visíveis e conteúdo de DNA . Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para avaliar a integridade da matriz celular e extracelular. Descelularização foi significativamente mais eficaz quando se utiliza os protocolos, incluindo ciclos de congelamento e descongelamento, deixando apenas cerca de 1% de resíduos de núcleos e 20% de DNA residual, enquanto que as amostras que não haviam sido submetidos a ciclos de congelamento-descongelamento adicionais continha cerca de 20% de núcleos residuais e 40% do DNA residual. Não foram observadas alterações da matriz extracelular morfológicas devido à descelularização.

ZHAO *et al.* (2013) a reparação da cartilagem é uma área desafiadora de investigação, por causa da capacidade de cura limitada de

cartilagem articular adulta. Desenvolvemos scaffolds para engenharia de tecidos de cartilagem in vivo em ratos. Estes scaffolds foram produzidos in vitro utilizando uma cartilagem natural, mantida a matriz extracelular MEC através da combinação de um processo de descclularização, com uma técnica de liofilização e foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, micro-tomografia computadorizada (micro-CT), coloração histológica, ensaio de citotoxicidade bioquímica e análise biomecânica digital. Este estudo sugere que a cartilagem como scaffold preservado de MEC é muito promissora para a engenharia de tecidos.

YU *et al.* (2013), descrevendo o benefício da substituição da válvula cardíaca em portadores de doenças valvulares, com o objetivo de preparar scaffolds naturais sem limitação com imunogenicidade, comparou a capacidade de diferentes procedimentos um grupo não foi descclularizado, usado como controle, outro grupo triton X e desoxicolato de sódio e em outro foi utilizado detergente enzimático e constatou-se que este último é o melhor método para descclularização, pois remove as células e mantém o scaffold íntegro da válvula.

FAULK *et al.* (2013), comentam que a escolha de detergentes utilizados para a descclularização do tecido pode ter um efeito marcante sobre a integridade da matriz extra celular deste tecido em bexiga urinária do bio scaffold resultante, a matriz foi avaliada através de imunomarcadores e microscopia eletrônica de varredura. O propanossulfonato, desoxicolato de sódio 4 % e dodecil sulfato de sódio a 1% desnaturaram as fibras de colágeno, e quando este tecido foi submetido à cultura celular, as células apresentaram alteração no fenótipo, diferente do triton X, que se mostrou com as células cultivadas com maior confluência e apresentaram um fenótipo normal.

O'NEILL *et al.* (2013), descreve que o único tratamento definitivo para a falência de órgãos em estágios finais é o transplante. A descclularização mantém a matriz extracelular e tem um grande potencial como scaffold, porque preserva a arquitetura complexa, biomecânica e

especificidade topológica do órgão. Foi estudado o pulmão de porco para servir como substituto biológico adequado para pulmão humano, foram avaliadas a viabilidade, crescimento e a atividade metabólica dos fibroblastos humanos, células epiteliais das vias aéreas pequenas e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo, e concluiu-se que a matriz extracelular suína pode ser um excelente scaffold para as aplicações de engenharia de tecidos.

Isino & Fujisato (2015) afirmam que os tecidos descelularizados, para transplante de órgãos e regeneração têm sido estudados no campo da engenharia de tecidos. No processo de descelularização, tensoativos, tais como sulfato de dodecil de sódio (SDS) foram mais comumente utilizado para remover os componentes celulares do tecido. No entanto, o surfactante residual pode ser citotóxica in vivo e tem sido relatada a dificuldade de remodelação após a implantação. Além disso, o tratamento com agentes tensoactivos pode destruir a estrutura importante da matriz extracelular (MEC) que permite que o tecido descelularizado para funcionar como um scaffold para as células. Neste estudo, os tecidos descelularizados, com elevada biocompatibilidade foram criadas utilizando o soro do destinatário. Por imersão de um tecido heterogêneo no soro condicionado para ativar o sistema do complemento e de DNase I, os seus componentes celulares podem ser removidos. Comparado a um enxerto tratados com SDS, o enxerto tratados com soro preservada a estrutura nativa da MEC. Quando implantadas subcutaneamente em um rato inato isogênico, o enxerto tratado com soro do destinatário resultou em menos imuno rejeição do que o enxerto tratados com SDS.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DESENHO DA PESQUISA

Este é um estudo: primário, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, comparativo, realizado em centro único. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob protocolo 87191 de 31/08/2012. (APÊNDICE I), obedecendo a Resolução 196/96, contemplando os aspectos éticos da pesquisa científica com seres humanos e concordância da participação no estudo foi previamente concedida pelo sujeito ou seu responsável legal, através da assinatura do TCLE.

Configuram como parceiros deste estudo a Faculdade de Engenharia de Materiais, Química e Mecânica da UNICAMP, projetos 07/58856-7, 07/59488-1, a FAPESP vinculada ao Projeto JP 07/51227-4, o CNPq vinculado ao projeto n° 573661/2008-1 do INCT Biofabris (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biofabricação) e FAPESP 08/57860-3, além do apoio da Rede Ibero-Americana de Biofabricação – Cytel. CNPq.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados candidatos à participação neste estudo os pacientes em tratamento ortodôntico, com indicação ortodôntica de remoção de dentes hígidos 1º.e 2º. pré-molares (superior e inferior), de ambos os gêneros, com idade entre 14 a 45 anos. Os pacientes devem ser saudáveis, não devem fazer uso crônico de medicamentos e devem possuir

os dentes em estágios de formação radicular completo. A concordância na participação voluntária deverá ser manifestada com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

4.3 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Não foram incluídos os pacientes que necessitem de cirurgias com indicação de odontosecção ou desgaste coronário, portadores de doenças infectocontagiosas ou anomalias dentárias de estruturas mineralizadas de qualquer natureza. Pacientes que tenham se submetido a clareamento dentário.

4.4 AMOSTRAS

As amostras de dentes primeiros e segundos pré-molares superiores e inferiores humanos foram obtidas a partir de doadores voluntários atendidos em consultório particular, sendo considerados como tecido de descarte cirúrgico, todas cirurgias foram realizadas pela mesma cirurgia dentista. Amostra foi cinquenta dentes pré-molares. Os dentes com indicação clínica de extração foram cirurgicamente removidos, sob anestesia local, Citanest, e de acordo com o protocolo descrito por (TORRES *et al.*, 2010). Os dentes foram transportados em meio de preservação, formol a 10%, sob a temperatura ambiente até o Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP.

O uso de medicamentos pós-operatórios foi prescrito pelo cirurgião, conforme a indicação e procedência da cirurgia. Os medicamentos incluem compostos de antibacterianos (penicilina), analgésicos (dipirona), anti-inflamatórios não hormonais (ibuprofeno) e hormonais. A técnica cirúrgica

caracterizou-se pelas seguintes etapas: 1) Antissepsia intra e extraoral com clorexidina a 2%; 2) Instalação de campos operatórios esterilizados; 3) Anestesia local com anestésico Citanest; 4) Sidesmotomia; 5) Exodontia com alavanca e fórceps, sem odontosecção; 6) condicionamento do dente em solução de formol a 10%, 7) Sutura; 8) Transporte para CTCmol para introduzir em substância desmineralizadora/ descelularizadora.

4.5 MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após extração os dentes foram mantidos em temperatura ambiente em uma solução de formol a 10%.

Em seguida, as amostras foram divididas em 2 soluções:

- Formol 10% (controle) 10 amostras Grupo 1 (G1);
- Tampão fosfato salino (PBS) e 28g de EDTA , 40 amostras;

Após 30 dias, as amostras que permaneceram no EDTA, foram divididas em :

- Hipoclorito de sódio a 2,5% , Grupo 2 (G2);
- Peróxido de hidrogênio a 40v, Grupo 3 (G3);
- Detergente enzimático associado a hipoclorito de sódio a 2,5%, Grupo 4 (G4);
- Detergente enzimático associado a peróxido de hidrogênio a 40v. Grupo 5 (G5).

As amostras foram distribuídas em seqüência em 5 grupos, com 10 dentes cada, sendo conservadas nas soluções durante 12 semanas.

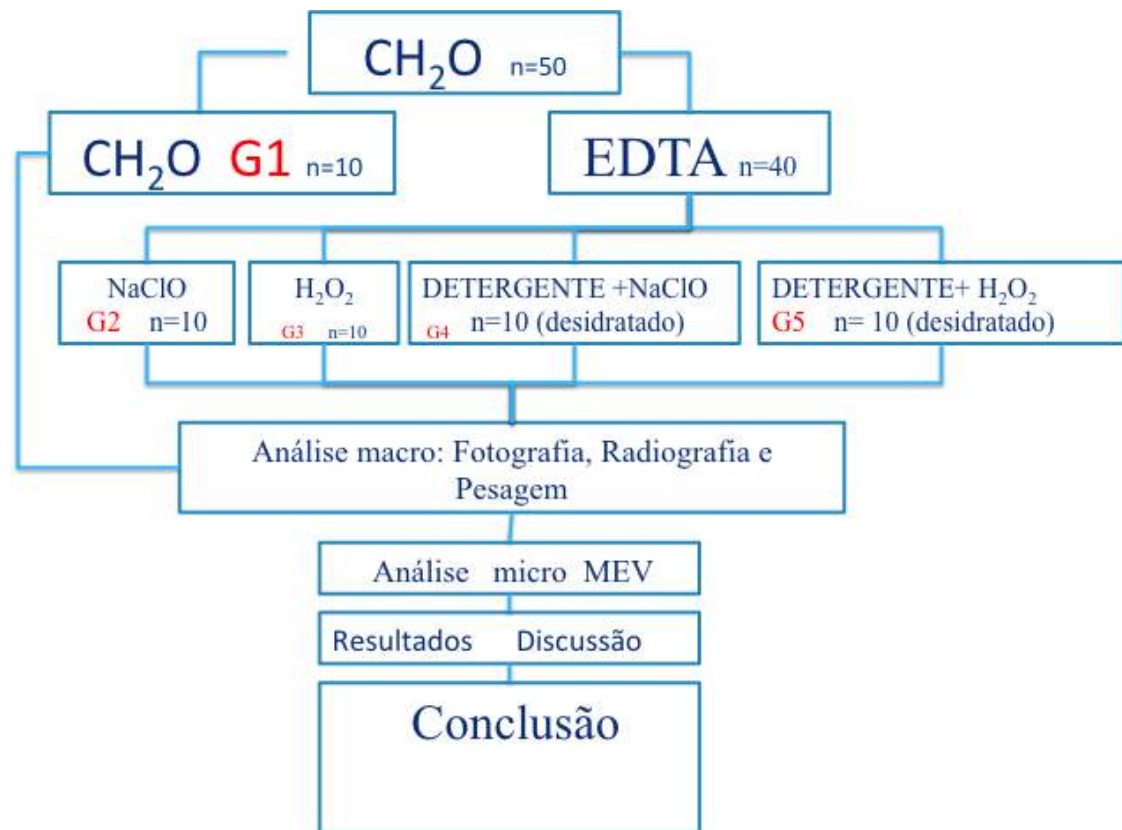


Figura 1 - Fluxograma

4.6 PESAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras foram pesadas a cada sete dias durante todo o período de estudo. O procedimento de pesagem foi realizado em balança de precisão (Shimadzu, modelo AY220 Max) 220g d=0,1mg tara 100%, com variação de 0,0001g. Este procedimento foi precedido por secagem em papel toalha absorvente, para remoção do excesso de solução.

Para homogeneização da amostra foi calculado o delta percentual.

4.7 REGISTRO DE IMAGENS

Os dentes foram fotografados, no plano longitudinal, antes e após o processo de desmineralização e descelularização, a 10 cm de distância, com posicionador radiográfico, utilizando uma câmera digital da marca Sony, com resolução de 8.1 mega pixels, objetiva fixa normal, de uma câmera compacta. Este registro teve por objetivo acompanhar alterações macro geométricas apresentadas. A classificação de acordo com a escala visual de coloração “VITA” foi feita por dois observadores independentes.

Todas as amostras foram radiografadas e realizada a captação de imagem de forma digital, antes e após o processo de desmineralização e descelularização, foi utilizado o aparelho de raio X da marca Dabi Atlante, Seletronic, com exposição de 0,30 segundos, conforme **FIGURA 2**.

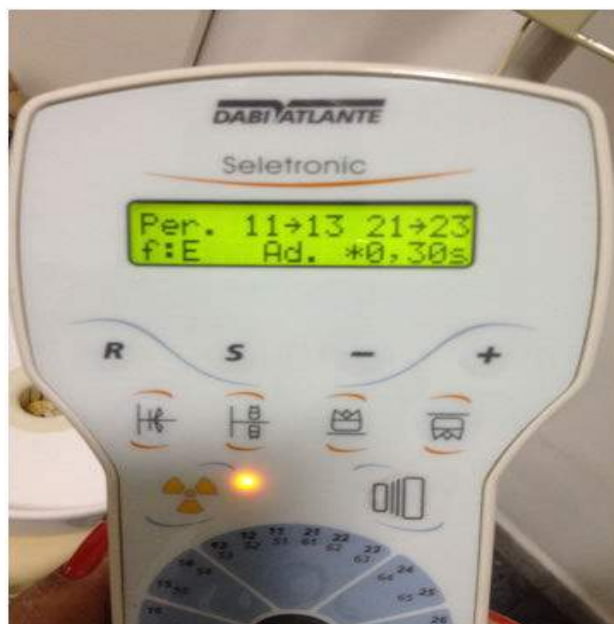


Figura 2 - Dispositivo para tomada de radiografia

Foram utilizadas as amostras de dentes higienizados, sendo que todos os dentes extraídos foram por indicação ortodôntica, destes, foram substituídos quatro amostras devido danos no dente, somente visualizados após tomadas radiográficas, os dentes substituídos foram 18,19,20 e 40.

As amostras foram radiografadas com um escalímetro construído em alumínio com 3 cm de comprimento, 1 cm de largura e 1 cm de altura mínima, com presença de dez degraus distanciando-se 0,3 cm entre si com altura de 0,1cm. Com a finalidade de se padronizar os diferentes tons de cinza observados nas radiografias.

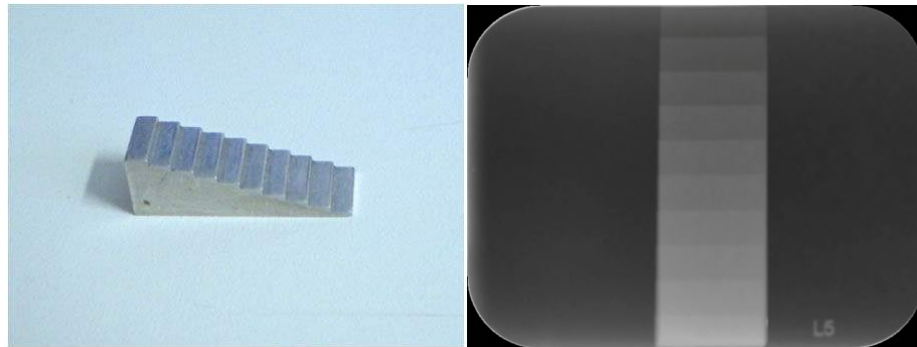


Figura 3 - Escalímetro

4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O preparo das amostras, para análise no MEV, foram desidratadas em estufa a 60°C durante 1 hora. Após esta etapa, as amostras foram seccionadas longitudinalmente com auxílio de um alicate de corte, sem a produção de *smear layer*, produto que poderia interferir na análise das amostras. As amostras permaneceram sobre uma camada de sílica gel recoberta por um papel absorvente em recipientes fechados hermeticamente. Em seguida, as amostras foram fixadas em stubs e cobertas com ouro através de depósito com auxílio de uma metalizadora, para então serem analisadas em MEV. A fixação das amostras nos *stubs* foi feita com o auxílio de uma fita adesiva carbonada, para não interferir na leitura dos elétrons na câmara do microscópio eletrônico de varredura.



Figura 4 - Dentes seccionados longitudinalmente após serem metalizados, antes de analisados em MEV



Figura 5 - Metalizador de amostras

Foram realizadas a secagem rápida nos grupos 1, 2, 3 e secagem lenta nos grupos 4 e 5. A razão para a secagem lenta era para dirimir a dúvida que a secagem rápida poderia interferir nas trincas do grupo de

hipoclorito, hipótese essa descartada, pois também na secagem lenta, as trincas apareceram.

Na secagem rápida foram introduzidas as amostras já nos *stubs* em estufa por uma hora, e com temperatura de 60^o C. Já na secagem lenta foram submetidas a álcool 70 %, antes de serem fixados aos *stubs*, e permaneceram por 24 horas desidratando lentamente, em caixa hermeticamente fechada com sílica gel.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras foram analisadas à microscopia eletrônica de varredura após 12 semanas do tratamento em diferentes soluções para a localização de canalículos dentinários, canal radicular, observar o esmalte, a dentina, cemento e a polpa dental. O equipamento utilizado foi LEO 435-VP alocado na ESALQ-USP em Piracicaba.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas 50 amostras. Os dados do presente estudo foram registrados em protocolo próprio, desenvolvido para este fim.

Para a análise dos resultados foram aplicados os seguintes testes:

1- Análise de variância de Friedmam (SIEGEL, 2006), com o objetivo de comparar as doze semanas do experimento em relação às perdas percentuais de peso dos dentes. Esta análise foi realizada, em separado para cada um das substâncias utilizadas para se obter a desmineralização e descelularização.

$$\text{Delta percentual} = \frac{\text{Semana inicial} - \text{Semana x}}{\text{Semana inicial}} \times 100$$

2- Análise estatística de variância de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 2006), para comparar o delta percentual do peso do dente antes e após a desmineralização/descelularização, com a finalidade de comparar cada um dos solventes em relação a perda de peso observadas em cada uma das doze semanas estudadas.

3- Teste do Quiquadrado para tabelas de Contingência (SIEGEL, 2006), com a finalidade de comparar os cinco solventes em relação às alterações da dentina; polpa; cimento; esmalte e cores.

4- Teste exato de Fisher (SIEGEL, 2006), com o objetivo de comparar os grupos submetidos, ou não, a ação do hipoclorito, em relação à presença de trincas no cimento quando submetidos ao exame de microscopia eletrônica.

Foi fixado em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Variáveis em estudo: dentes de diferentes pacientes com estruturas distintas de acordo com a estrutura genética individual. A amostra foi composta de 50 dentes pertencendo a cada grupo o número de 10 dentes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

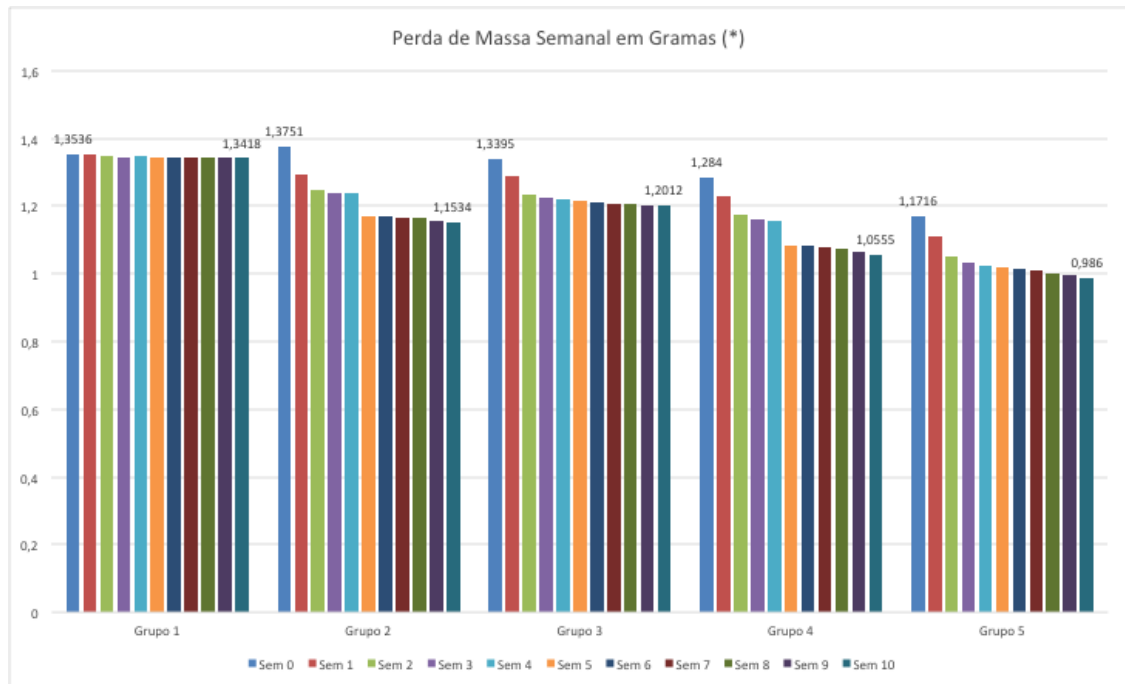


Figura 6 - Gráfico da perda de massa semanal em gramas (*)

Este gráfico representa a perda de massa medida em gramas nos grupos de dentes submetidos ao processo de desmineralização e descelularização durante as doze semanas do estudo.



Figura 7 - Delta percentual quanto a perda de massa (*)

Análise estatística de variância de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 2006), para comparar o delta percentual do peso do dente antes e após a desmineralização/descelularização, com a finalidade de comparar cada um dos solventes em relação a perda de peso observadas em cada uma das doze semanas estudadas.

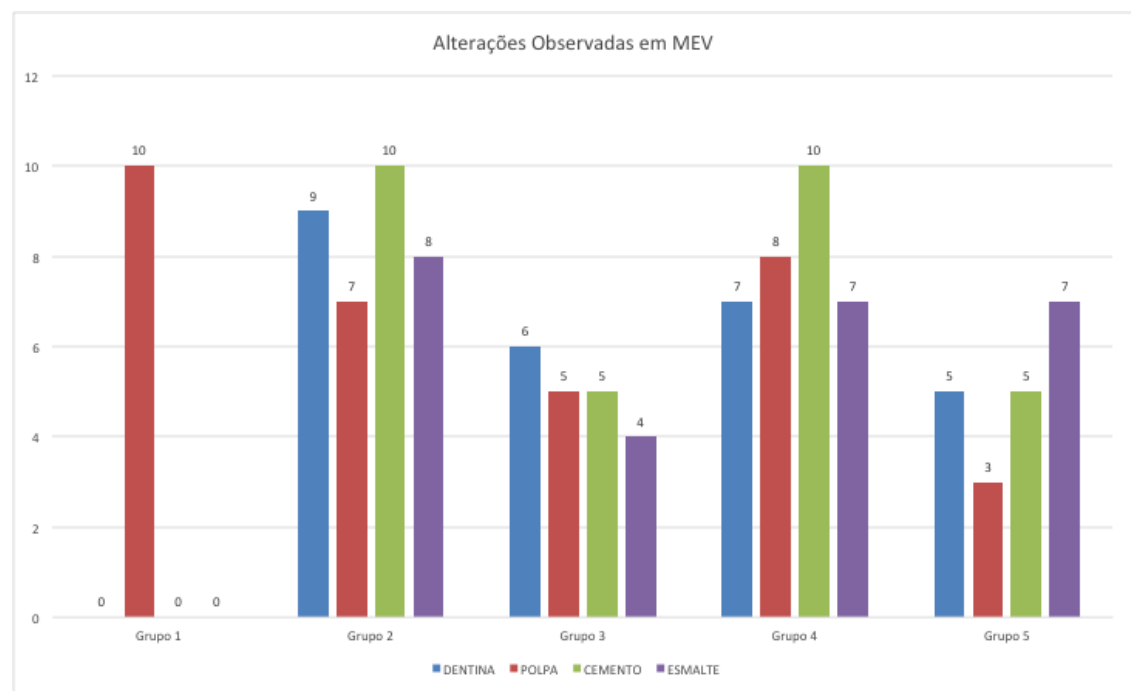


Figura 8 - Alterações observadas MEV (*)

Foram observadas alterações nos grupos quando comparados ao grupo 1, na dentina, no cimento e no esmalte.

No grupo 1 a polpa permaneceu em todas as amostras.

Tabela 1 - Dentes do grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança da dentina no critério observado em microscopia eletrônica de varredura.

	Dentina		Total	% de alteração
	Sim	Não		
Grupo 1	0	10	10	0%
Grupo 2	9	1	10	90%
Grupo 3	6	4	10	60%
Grupo 4	7	3	10	70%
Grupo 5	5	5	10	50%
Total	27	23	50	54%

Teste do quiquadrado
 $X^2_c = 9,488$ $X^2 = 18.196^*$
 (p= 0,0011*)
 G2 e G4 > 1,5

Tabela 2 - Dentes dos grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança presença de polpa no critério de microscopia eletrônica de varredura.

	Polpa		Total	% Presença
	Sim	Não		
Grupo 1	10	0	10	100%
Grupo 2	7	3	10	70%
Grupo 3	5	5	10	50%
Grupo 4	8	2	10	80%
Grupo 5	3	7	10	30%
Total	0	33	17	0%

Teste do quiquadrado
 $X^2_c = 9,488$ $X^2 = 13.012^*$
 (p= 0,0112*)
 G5 e G3 removeram mais a polpa

Tabela 3 - Dentes do grupo controle 1 e experimentais 2,3,4,5 segundo a semelhança do cimento no critério de microscopia eletrônica de varredura

	Cimento			% de alteração
	Sim	Não	Total	
Grupo 1	0	10	10	0%
Grupo 2	10	0	10	100%
Grupo 3	5	5	10	50%
Grupo 4	10	0	10	100%
Grupo 5	5	5	10	50%
Total	30	20	50	60%

Teste do quiquadrado
 $\chi^2_c = 9,488$ $\chi^2 = 29.167^*$
 (p < 0,001*)
 G2 e G4 > G1, G3 e G5

Tabela 4 - Dentes dos grupos controle 1 e experimentais 2, 3, 4, 5 segundo a semelhança de esmalte no critério de microscopia eletrônica de varredura.

	Esmalte		Total	% de alteração
	Sim	Não		
Grupo 1	0	10	10	0%
Grupo 2	8	2	10	80%
Grupo 3	4	6	10	40%
Grupo 4	7	3	10	70%
Grupo 5	7	3	10	70%
Total	26	24	50	52%

Teste do quiquadrado
 $\chi^2_c = 9.488$ $\chi^2 = 17.147^*$
 (p=0,0018*)
 G1 E G3 < G2, G4 E G5

Tabela 5 - Dentes dos grupos controle 1 e experimentais 2, 3, 4, 5 segundo alteração de coloração

	COLORAÇÃO		Total	% de alteração
	Sim	Não		
Grupo 1	0	10	10	0%
Grupo 2	10	0	10	100%
Grupo 3	10	0	10	100%
Grupo 4	10	0	10	100%
Grupo 5	10	0	10	100%
Total	40	40	50	80%

Teste do quiquadrado
 $\chi^2_c = 9,488$ $\chi^2 = 50.000^*$
 (P < 0,001*)
 G1 < G2, G3, G4, G5

Tabela 6 - Presença de trinca no cimento nas amostras

	Trincas cemnto		Total	% de trincas
	Sim	Não		
Grupo 4 e 2 Com Hipoclorito de sódio	20	0	20	100%
Grupo 1,3 e 5 Sem Hipoclorito de Sódio	0	30	30	0,0%
Total	20	30	50	

Teste exato de Fisher
($p = 0,0000^*$)

Todas as amostras submetidas a solução de hipoclorito de sódio apresentaram trincas no cimento.

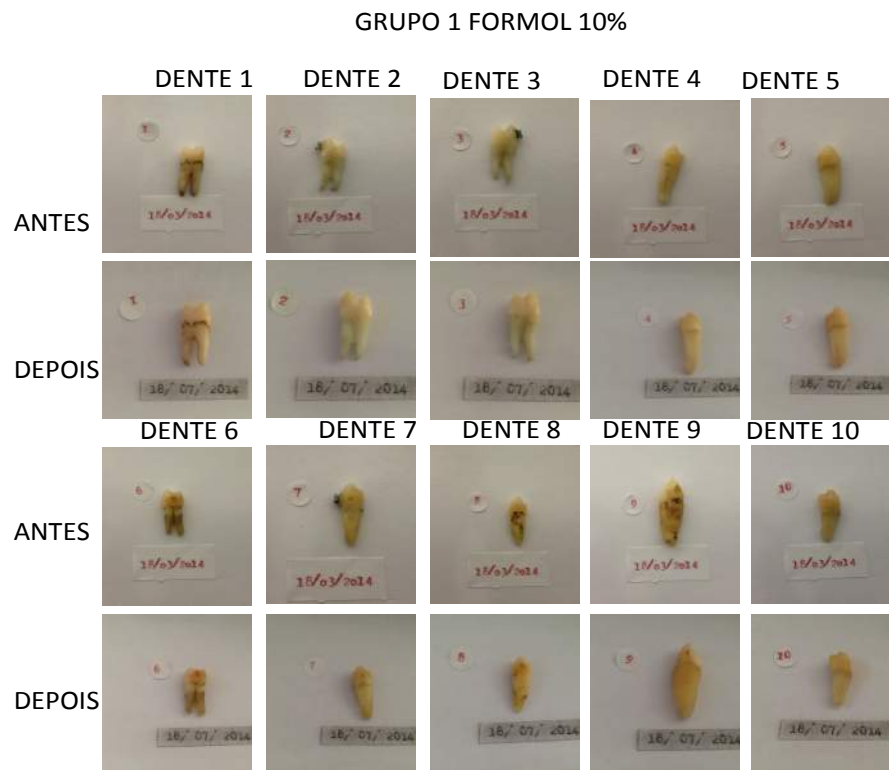


Figura 9- Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 1

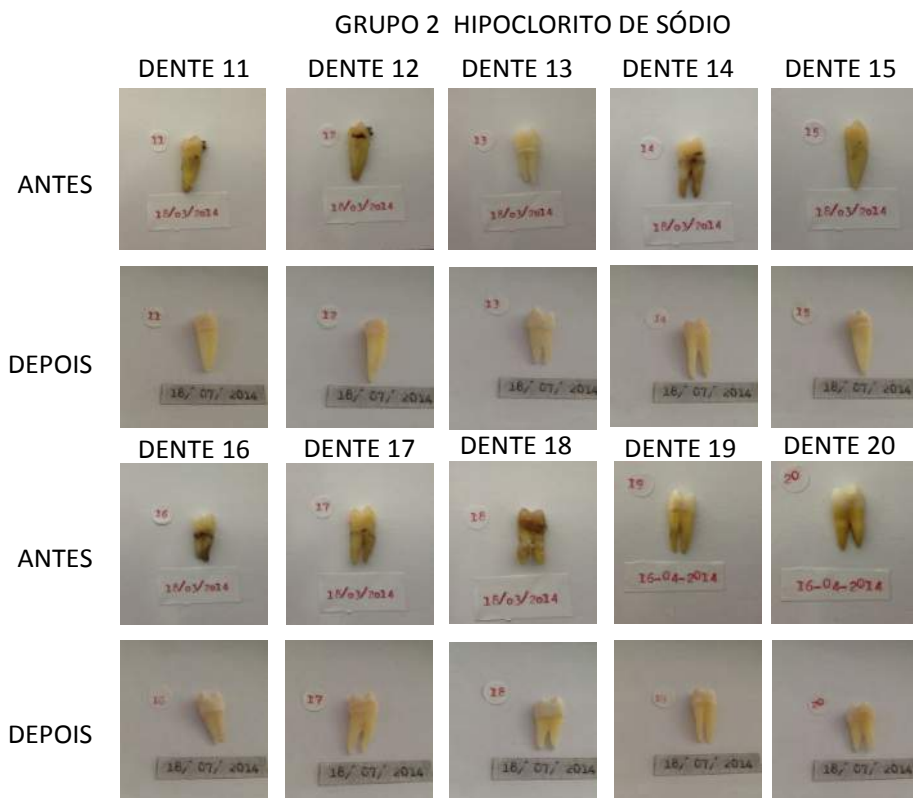


Figura 10 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 2



Figura 11 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 3

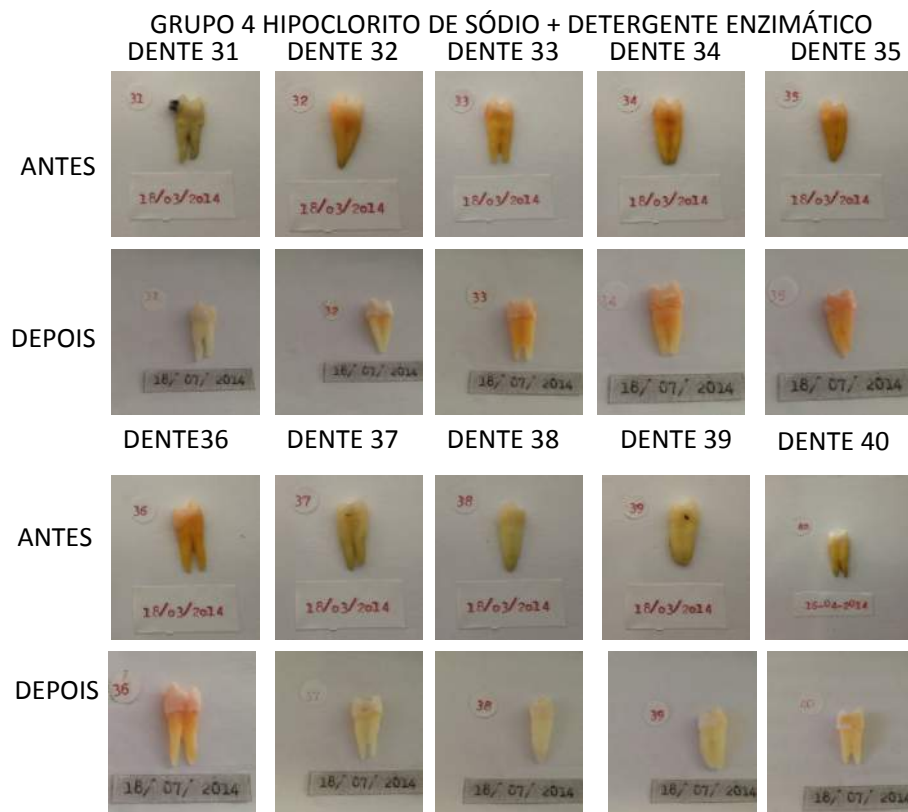


Figura 12 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 4

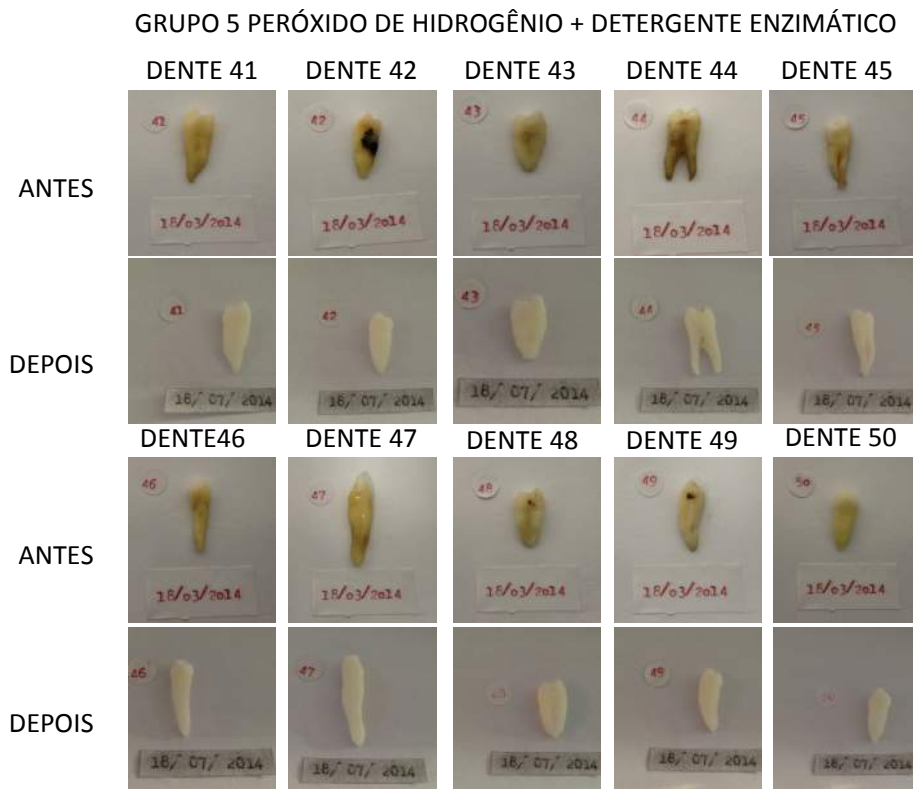


Figura 13 - Fotografia das amostra de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 5

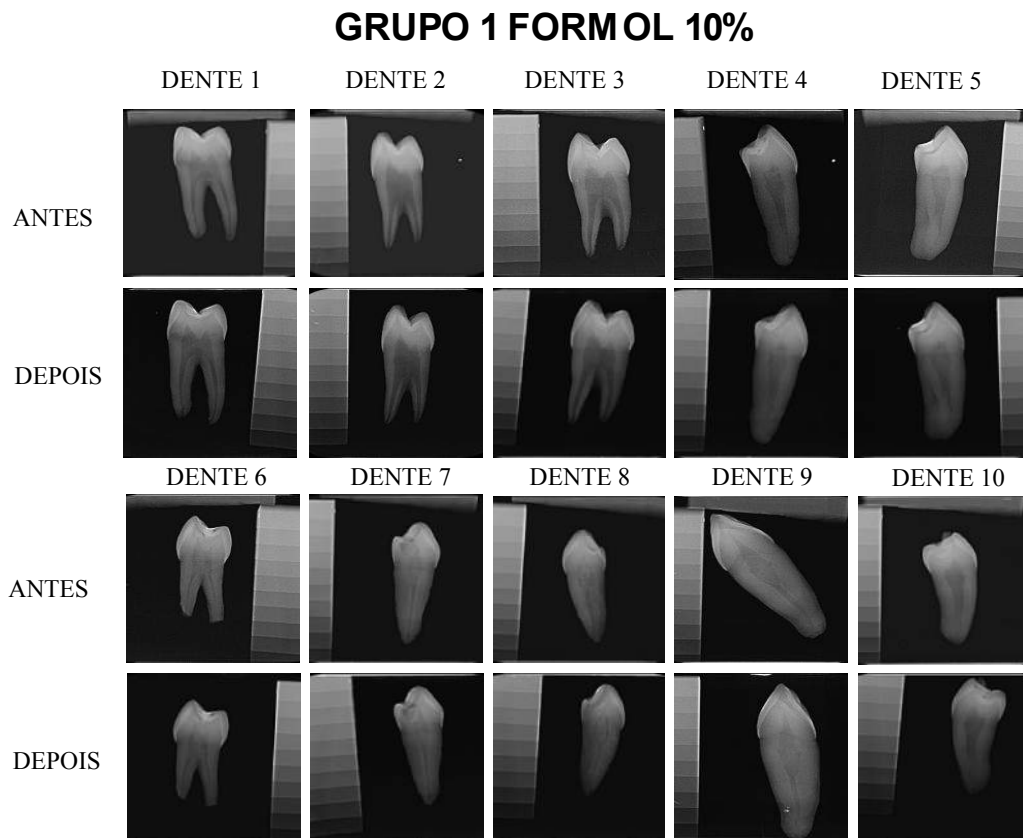


Figura 14 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 1



Figura 15 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 2.

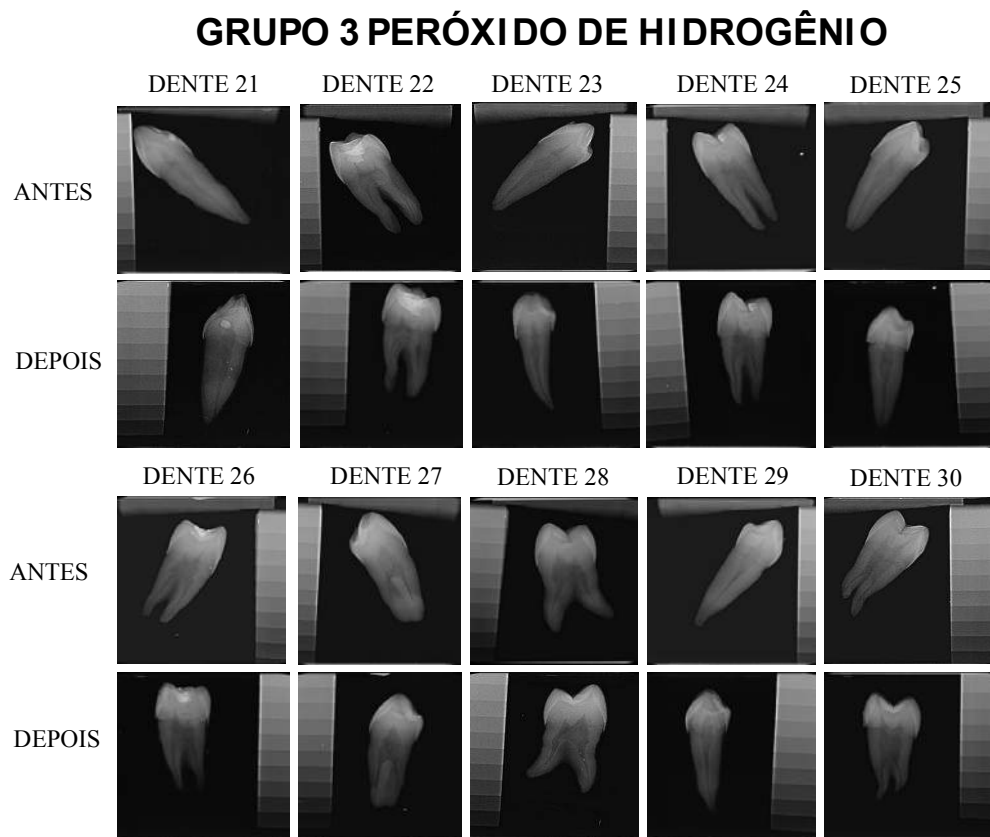


Figura 16 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 3

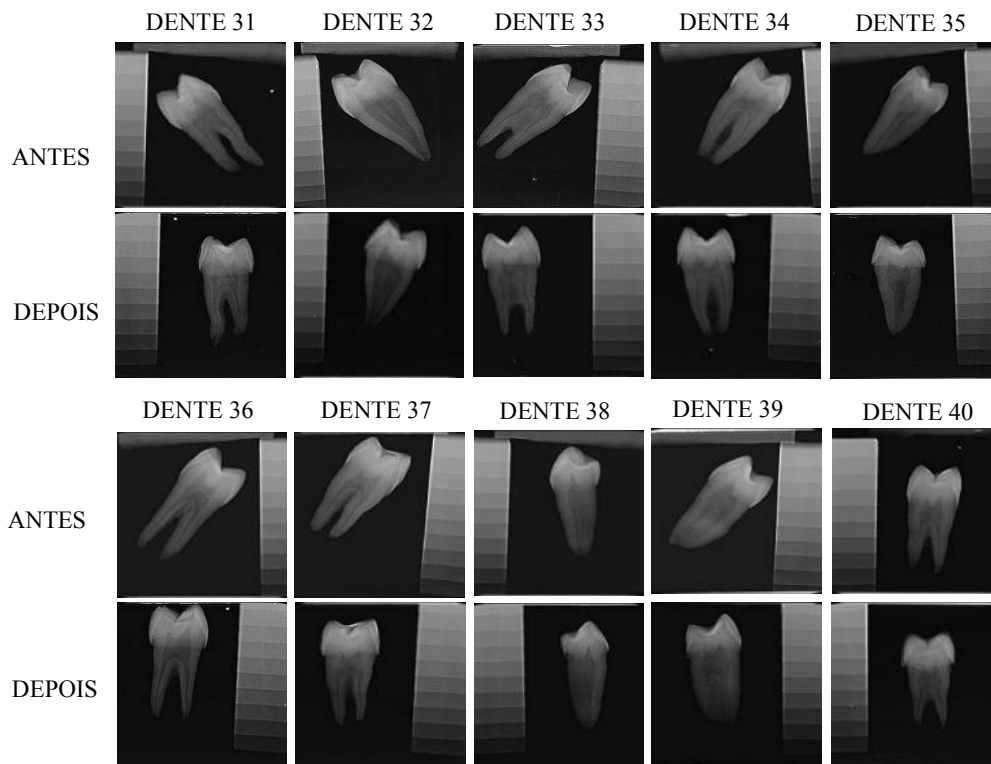
GRUPO 4 HIPOCLORITO DE SÓDIO + DETERGENTE

Figura 17 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 4

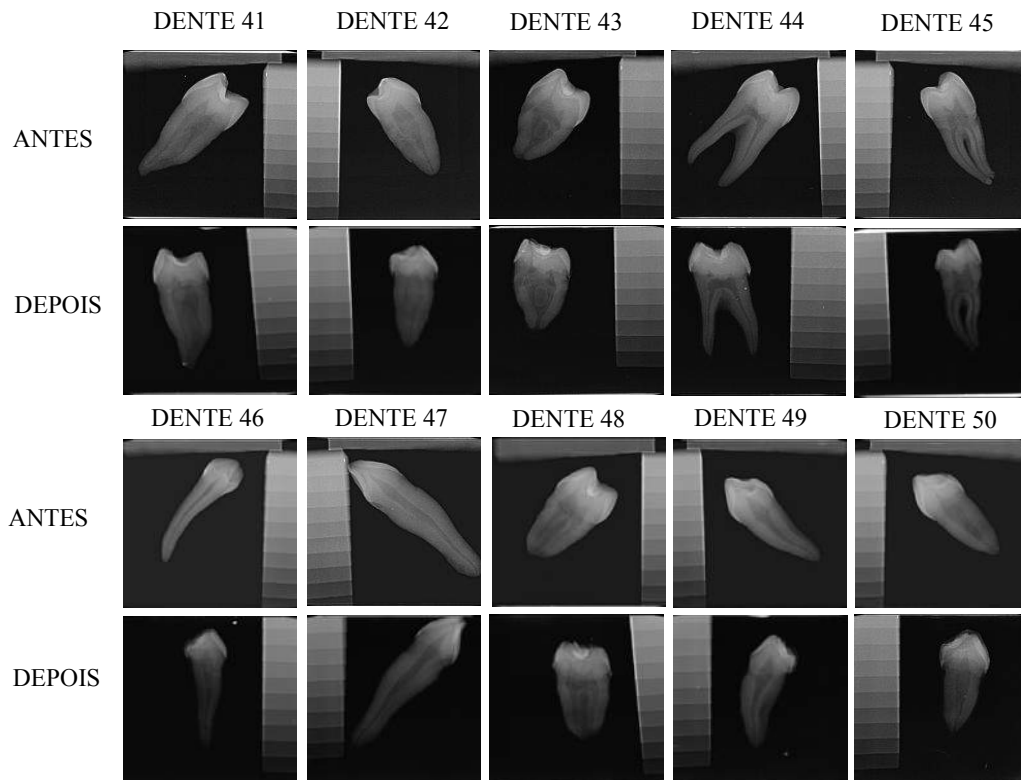
GRUPO 5 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO + DETERGENTE

Figura 18 - Radiografia das amostras de dentes pré-molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização no grupo 5

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As modificações advindas da introdução dos conceitos da Engenharia Tecidual como nova estratégia terapêutica beneficiarão sobremaneira os pacientes, pois conduziram os profissionais da saúde a grandes avanços tecnológicos .

A descelularização, remoção das células de um tecido ou de um órgão, é uma reação complexa, pois existem as proteínas estruturais e funcionais que constituem a matriz extracelular (MEC), e esta não pode ser danificada, uma vez que para as células poderem se expressar adequadamente, há a necessidade dessa matriz manter as características originais desse tecido. As soluções utilizadas podem interferir na MEC e alterar sua ultraestrutura, por outro lado, se não houver remoção completa do conteúdo biológico no momento da implantação desse tecido em um hospedeiro, pode haver resposta inflamatória de imuno competente frente a esse corpo estranho. Diante desse objetivo, foram selecionadas substâncias utilizadas para limpeza e sanificação do elemento dentário usados rotineiramente em Odontologia, no propósito de não agredir a estrutura dentária que nos possibilite a preservação da MEC, remoção celular e consequentemente obter um melhor scaffold.

Para conseguir a limpeza da estrutura dentária que possui uma camada mineral extremamente rígida, houve necessidade de se desmineralizar primeiro e atingir o interior dessa estrutura onde está a polpa, tecido conjuntivo que apresenta vasos, artérias e nervos. Essa desmineralização acontece por meio de substâncias quelantes e/ou ácidas, que retiram o cálcio presente nesse tecido mineral, para que outras substâncias em sequência consigam penetrar e promover uma adequada

higienização. Outra maneira é promover um orifício na estrutura coronariana do dente onde a polpa apresenta seu maior volume, porém com esta manobra se perderia a integridade, e preservação completa da MEC.

SCAFFOLDS (ASTM) são substratos à base de biomateriais para utilização em Regeneração Tecidual com habilidade para comportar atividades celulares, fármacos, genes, etc..., são suportes, arcabouços ou andaimes, com material biocompatível, reabsorvível ou não. Utilizado para regenerar tecidos ou organizar células, auxiliar as células na confecção de sua nova matriz extracelular. Existem três tipos básicos: Sólido, Fibra e Gel. O melhor scaffold seria o natural por já ter ali mantido a presença de células vivas em atividade, o propósito de mimetizar este *scaffold* é estudar qual a porosidade, consistência, enfim copiar ao máximo sua macro e microgeometria.

Prosecká et al (2011) confirma que há interferência na porosidade e também no diâmetro dos poros, para que as condições nas células mesenquimais se diferenciem em osteoblastos, colágeno e na matriz de hidroxiapatita, e que, mesmo aumentando a rigidez do colágeno do *scaffold*, não foi suficiente para a formação do tecido ósseo, muitos fatores influenciam, e com certeza uma aproximação maior com o tecido de origem pode facilitar a diferenciação celular. Concordando com isto, Gillete et al (2011) confirmam que a força significativa de adesão em relação ao tecido demonstram como as estruturas da fibra do colágeno, podem ser projetadas dentro de todas as regiões de um *scaffold* multifase do tecido, explorando o conhecimento do conjunto do colágeno, e apresenta uma aproximação à estrutura do colágeno original. Na mesma linha, Kim et al (2011), estudando o potencial de diferenciação osteogênica dos pré-odontoblastos avaliou diferentes tamanhos de poros

nos *scaffolds*, e sugerem fortemente que eles forneceram uma plataforma altamente útil para a ET óssea. Observamos que durante o processo de descelularização e desmineralização as substâncias interferem na limpeza destes poros tornando-os mais acessíveis, pois a estrutura dentária possui uma rede de canalículos dentinários extremamente organizada que protegem e facilitam a nutrição do tecido pulpar.

Gupte & Ma (2011) afirmam que materiais frequentemente são biomimetizados para que *scaffold* incorporem características e imitem a MEC, e possuam características de suportar células a criar um ambiente capaz de facilitar a adesão, a proliferação, e a diferenciação das células e promover o campo da regeneração tecidual.

Biomimetizar é chegar o mais próximo do ideal, do natural, copiando a natureza, para atingir este esperado *scaffold*, muitos estudos se propõem a descelularizar/desmineralizar.

Na literatura, autores utilizam o EDTA com o propósito de desmineralizar, como Neves et al (2011), que afirma em seus resultados que não há nenhum problema nos tecidos que requerem a descalcificação, e que o EDTA é a melhor escolha para a desmineralização nos casos que não são urgentes. Zacaro et al (2010) diz que em 28 dias, o EDTA se comporta com boas características no processo de desmineralização. Wang (2007) aponta que a velocidade de descalcificação aumentou com diminuição do pH da solução. Pérez (2008) afirma em seu trabalho que o EDTA chega a extrair 86.72% de cálcio, além de Emans et al (2005) concluir que a descalcificação com EDTA de 10% é também o método o mais seguro de descalcificação. Diante destas considerações a escolha pelo desmineralizante foi o EDTA de 28g diluído em PBS em um pH 4, no

intuito de aumentar a velocidade da desmineralização, para isto foram realizados testes piloto para que tivemos segurança e controle na desmineralização sem que destruíssemos toda a MEC.

Como o EDTA permite a exposição adequada das células aos agentes descelularizadores, fornecendo um trajeto para que o material celular seja removido do tecido e promovendo a limpeza, foram selecionadas substâncias que facilitam esta remoção de restos celulares e tecidos dos dentes a serem descelularizados.

Inicialmente, foi realizado um projeto piloto, para aprimorar a técnica de descelularização e desmineralização foi realizado em cinco dentes, sendo quatro do mesmo indivíduo e um recém-extraído de outro indivíduo. Foram distribuídos da seguinte forma:

não recebeu solução de fixação,

hipoclorito de sódio,

peróxido de hidrogênio

peróxido de hidrogênio mais detergente enzimático.

Neste piloto foi possível observar que o dente que recebeu peróxido de hidrogênio mais detergente enzimático apresentou as melhores características de limpeza; então no propósito de verificar se a substância que faria diferença seria o detergente enzimático, foi incluído um grupo de hipoclorito de sódio com esse composto.

Para observar diferenças entre o grupo controle formol 10% e do dente recém-extraído sem fixação, foi realizado a microscopia eletrônica de

varredura (MEV) e não apresentou diferenças, pois o dente mantido em formol se manteve com as mesmas características do recém-extraído.

As amostras foram fotografadas, radiografadas no início do processo e mantidas em frascos de vidro durante todo o período de descelularização e desmineralização. Elas foram eliminadas o excesso de substâncias e pesadas semanalmente. Após este período foram radiografadas no final do tratamento e submetidas ao processo de secagem das amostras, com etanol 70 %, etanol absoluto e estufa à 60⁰C, para análises ao microscopia eletrônica de varredura.

Foram analisados 50 dentes pré-molares, sendo 10 dentes em cada grupo, o grupo 1 nos serviu de controle pois foi comparado um dente recém extraído com os dez dentes deste grupo após todo o período do processo, e não se observou diferença nas amostras, manteve-se as características originais, por isso foi possível comparar a semelhança nos critérios dentina, polpa, cimento, coloração e trincas presentes no cimento. As amostras do grupo formol apresentaram as mesmas características tanto macro quanto microscópicas antes e depois do processo de desmineralização e descelularização.

O grupo 2 e 4 foi utilizado o hipoclorito de sódio, substância se utiliza frequentemente em Odontologia para sanificação do canal radicular durante o preparo químico mecânico em tratamento endodôntico. O grupo 3 e 5 foi utilizado o peróxido de hidrogênio muito usado para clareamento dentário e limpeza, componente de vários cremes dentais. No grupo 4 e 5

houve uma desidratação previa das amostras, foi utilizado detergente enzimático e no preparo para a microscopia eletrônica de varredura foi realizado desidratação com etanol e estufa, enquanto nos grupos 1, 2 e 3 foi realizada uma desidratação somente com sílica e estufa.

Após o tratamento não foram encontradas células vivas, somente alterações nas propriedades estruturais e menor concentração de cálcio com consequente redução de peso, e alteração na MEC.

A solução de hipoclorito de sódio age mais na primeira semana, e vai perdendo sua ação devagar, enquanto que no grupo peróxido perde massa uniformemente durante todo o período.

No grupo 3, detergente enzimático associado ao hipoclorito, houve uma aceleração quanto a perda de massa, mas isto não ocorreu no grupo 5 peróxido de hidrogênio com detergente enzimático. Mas grupo 4 e o grupo 5 quanto a perda de massa não diferiram em porcentagem, porque ambos foram desidratados, embora no grupo 5 mostrou-se melhor visualmente através da análise em MEV. No grupo 2 a dentina apresentou mais alteração que nos outros grupos.

Diante do tratamento aplicado às amostras, não existem células vivas, entretanto, foram observadas alterações importantes nas propriedades estruturais e menor concentração de cálcio, com consequente redução de peso das amostras, e apresentaram uma descoloração evidente, com exceção do grupo 1 considerado controle, nas quais as amostras permaneceram com o mesmo peso, cor e forma.

As amostras do grupo 5 submetidas ao tratamento com peróxido associado ao detergente enzimático apresentaram alterações de

componentes estruturais do dente, mesmo assim, promoveu uma limpeza maior em relação aos outros grupos, com ausência de sombras na imagem do MEV embora 30% deste grupo ainda foram observados restos pulpares.

Na solução de hipoclorito de sódio, observou-se que a polpa permaneceu muito dilacerada e destruída, o que não era esperado visto que esta solução é utilizada na prática clínica para irrigação endodôntica e sanificação do canal.

O hipoclorito de sódio pode não ter apresentado suas melhores características, pois o recipiente onde as amostras sofreram o processo de desmineralização e descelularização era transparente, podendo ter alterado o resultado, uma vez que a luz inativa a ação do hipoclorito de sódio, porém neste grupo 2 e 4 ocorreu em todas as amostras trincas no cimento, sabe-se que após o tratamento endodôntico o órgão dentário fica extremamente fragilizado podendo se quebrar com facilidade, o que gera uma preocupação em se construir núcleos e coroas para estes elementos, acredita-se que isto ocorra devido a uma perda de nutrição do elemento uma vez que o conduto endodôntico é obliterado por material inerte, outra hipótese ficou muito clara neste estudo é que se esta solução causa trincas no cimento isto pode colaborar para esta fragilidade apresentada na estrutura do elemento dental.

Pérez et al (2008), a solução de 2.5% NaOCl extraiu quantidades insignificantes de cálcio, visto que o EDTA de 15% extraiu maior quantidade de cálcio, optei pela utilização de um EDTA ainda mais agressivo, usando EDTA de 28%.

Lottanti (2009) afirma que a solução desmineralizante associadas com NaOCl corrói a dentina, não sendo interessante, uma vez que Gillete et al (2011) afirma a importância de manter a MEC para ser um diferencial

para poder direcionar melhor o comportamento celular. Como Bichara et al (2011), afirma que no avanços em ET se deve aos modelos se aproximarem dos tecidos originais em densidade, características mecânicas e fontes celulares para projetar o tecido.

Mostrou melhor performance o grupo 5 porém houve perda de coloração, e diminuição de massa, durante o período de utilização do EDTA, ocorreram alteração na MEC, e a presença de polpa residual em todos grupos, demonstra que o método conforme descrito não garante a total descelularização, apesar da desmineralização ter ocorrido com sucesso em todos os grupos.

No aspecto fotográfico foram observadas alterações de coloração dos dentes, conforme se apresenta na tabela 5, os dentes que receberam o tratamento com peróxido de hidrogênio a perda de coloração foi mais evidente, embora todos perderam cor. Os dentes mantiveram suas características macroscópicas.

No aspecto radiográfico foram analisados os critérios de radiopacidade, de forma e tamanho. Com exceção do grupo 1 todos os grupos que foram submetidos ao EDTA sofreram desmineralização perderam cálcio e conseqüente alteraram na radiopacidade. Nos critérios de forma e tamanho anatômico radiográfico não apresentaram diferenças.

A Engenharia Tecidual visa eliminar o doador de órgão por Langer, Vacanti (1993), embora necessitemos biomimetizar para obter conhecimentos que nos ajudem a ter referências amplas, pois a falta de padrão para o desenvolvimento do neo tecido nos obriga a tomar condutas e estratégias para alcançar o objetivo maior da Odontologia que é a reposição das perdas dentais, não reparando e sim regenerando o órgão dentário.

A reparação da perda dental, hoje, é realizada de maneira eficiente através de implantes dentários em titânio quando há osso, sabemos que esta é a melhor prótese acessível atualmente, mas estudos apontam que seu material pode ser cancerígeno e já se encontrou partículas deste material em tecido neural, por isso os estudos devem crescer com a biologia molecular. Profissionais vislumbram novos horizontes terapêuticos almejando soluções biológicas para soluções de antigos problemas.

Os dentes descelularizados e desmineralizados podem ser utilizados como *scaffold* em Engenharia Tecidual.

PERSPECTIVAS

Utilizar estas amostras como *scaffolds* naturais e semear cultura celular, avaliar sua toxicidade e sua performance quando comparada a *scaffolds* em biomateriais, pois acredita ser um substituto ideal para utilização em Engenharia Tecidual.

Encontrar uma substância que possa dissolver a polpa totalmente sem alterar a forma original do dente, preservando a MEC, talvez a possibilidade do uso de 25% de HNO_3 .

Será interessante estudar uma forma alternativa de preservação das amostras sem fixação em formol, antes do processo de desmineralização e descelularização, pois a fixação prévia em formol de todas as amostras pode ter influenciado no processo e ter causado a não remoção eficiente da polpa.

O ultrassom auxilia na limpeza das amostras, porém não é suficientemente capaz de remover toda a polpa. O ideal seria promover um preparo químico mecânico, porém a abertura coronária prejudicaria a forma e contorno do *scaffold*.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O melhor método para desmineralizar e descelularizar dentes viabilizando-os como scaffolds naturais nesta amostra foi o grupo 5 (desidratado, EDTA, peróxido de hidrogênio, detergente enzimático), porém 30% ainda apresentou resíduos biológicos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- 1- Baiguera, S., Gonfiotti, A., Jaus, M., Comin; C.E., Paglierani, M., Galdio, C., Bianco, A., Ribatti, D., Macchiarini, P. Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials*. 2011; 32: 4433-42.
- 2- Baptista, Pedro Miguel Almeida de Matos. Liver regeneration and tissue engineering. Tese de Doutorado da Universidade de Lisboa, 2008.
- 3- Bernard MP, Chu MI, Myers JC, Ramirez F, Eikenberry EF, Prockop DJ. Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution, *Biochemistry* 1983; 22:5213-23.
- 4- Bichara DA, O'Sullivan NA, Pomerantseva I, Zhao X, Sundback CA, Vacanti J, Randolph MA. The Tissue Engineered Auricle: past, present and future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Aug 9.
- 5- Borina, G., Beckerb, AN., Oliveira,EPM.A História do Hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. *Revista de Endodontia Pesquisa e Ensino On Line - Ano 3, Número 5, Janeiro Junho, 2007.* 1 <http://www.ufsm.br/endodontiaonline>
- 6- Brancini, M.R.; Bramane, C.M.; Berbert, A. Poder de limpeza de algumas soluções irrigadoras analisadas pela microscopia de varredura. *Rev. Paul. Endodont.* 4 (1/14): 116-23, jan./dez., 1983

-
- 7- Burk J, Erbe I, Berner D, Kacza J, Kasper C, Pfeiffer B, Winter K, Brehm W. Freeze-Thaw Cycles Enhance Decellularization of Large Tendons. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Jul 23
 - 8- Cong, Y.Y., Xue, J.X., Zhang, W.J., Zhou, G.D., Liu, W., Cao, Y. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials*. 2011;32: 2265-73.
 - 9- Challa S. S. R. Kumar, Josef Hormes, Carola Leuschner. *Nanofabrication towards biomedical applications: techniques, tools, applications, and impact*. [S.l.: s.n.], 2005. 420 p.
 - 10- Deeken, C.R., White, A.K., Bachman, S.L., Ramshaw, B.J., Cleveland, D.S., Loy, T.S., Grant, S. A. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *Journal of biomedical Materials research*.2011(96B)2: 199-208.
 - 11- Duailibi SE, Duailibi M, Zhang W, Ariscan R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of Dental Research*. 2008;87:745-50.
 - 12- Duailibi MT, Duailibi SE, Young C, Bartett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research, Estados Unidos*. 2004;83(7):523-38.
 - 13- Duailibi MT, Duailibi SE, Duailibi Neto EF, Negreiros RM, Jorge WA, Ferreira LM, Vacanti JP, Yelick PC. Tooth Tissue Engineering: Optimal Dental Stem Cell Harvest Based on Tooth Development. *Artif Organs*.2011 ;2(2):1-7.
 - 14- Emans PJ, Bulstra SK, Kuijer R. The effects of different decalcification protocols on TUNEL and general cartilage staining. *Biotech Histochem*. 2005 May-Aug;80(3-4):111-5.

-
- 15- Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, Kramer CR, Reing JE, Zhang L, D'Amore A, Badylak SF. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):183-93. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.006. Epub 2013 Sep 18.
- 16- Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011 Jul;23(3):333-9.
- 17- Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F. Decellularization of tissue and organs. *Biomaterials.* 2006. (27): 3675-83.
- 18- Gillette BM, Rossen NS, Das N, Leong D, Wang M, Dugar A, Sia SK. Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues. *Biomaterials.* 2011 Nov;32(32):8067-76. Epub 2011 Aug 12.
- 19- Goldstein, J., Newbury, D., Alegria, D., Lyman, C., Echlin, P. Lifshin, E. Sawyer, L. e Michael, J. . *Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise de raios-X*, 3^a ed., Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nova York (2002).
- 20- Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg* 1988; 68: 117-23.
- 21- Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications. *J Dent Res.* 2011 Aug 9.
- 22- Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004; 10: 1346-58
- 23- Ishino N1, Fujisato T. Decellularization of porcine carotid by the recipient's serum and evaluation of its biocompatibility using a rat autograft model. *J Artif Organs.* 2015 Jan 31.
- 24- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia básica: texto/atlas*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 185.

- 25- Kajbafzadeh AM, Masoumi A, Hosseini M, Borjian MA, Akbarzadeh A, Mohseni MJ Sheep colon acellular matrix: Immunohistologic, biomechanical, scanning electron microscopic evaluation and collagen quantification. *J Biosci Bioeng.* 2013 Aug 28
- 26- Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Activity of Matrix Metalloproteinases in Bovine versus Human Dentine. *Caries Res.* 2011 Jan 27; 45(5):429-434.
- 27- Kim J, Magno MH, Alvarez P, Darr A, Kohn J, Hollinger JO. Osteogenic Differentiation of Pre-Osteoblasts on Biomimetic Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds. *Biomacromolecules.* 2011 Aug 12.
- 28- Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009 Apr; 42(4):335-43. Epub 2009 Feb 7.
- 29- Lu, H., Hoshiba, T., Kawazoe, N., Chen, G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2011 (32): 2489-99.
- 30- Mirsadraee, S., Wilcox, H. E., Korossis, S.A., Kearney, J.N., Watterson, K.G., Fisher, J., Ingham, E. Development and Characterization of an Acellular Human Pericardial Matrix for Tissue Engineering. *Tissue Engineering.* 2006. (12)4:763-73.
- 31- Navarro, F B et al. Evaluation of the biological behavior of decellularized pulmonary homografts: an experimental sheep model. *Rev Bras Cir Cardiovasc [online].* 2010, vol.25, n.3, pp. 377-387. ISSN 0102-7638.

-
- 32- Neves Jdos S, Omar NF, Narvaes EA, Gomes JR, Novaes PD. Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. *Acta Histochem.* 2011 Jul; 113(4): 484-8.
- 33- Nirmala R, Kang HS, El-Newehy MH, Navamathavan R, Park HM, Kim HY. Human osteoblast cytotoxicity study of electrospun polyurethane/calcium chloride ultrafine nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Jun;11(6):4749-56.
- 34- Nolla CM. The development of the permanent teeth. *J. Dent. Child.* 1960;27:254-66.
- 35- O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, Singh G, Freytes DO, Bacchetta MD, Sonett JR, Vunjak-Novakovic G. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2013 Sep;96(3):1046-55; discussion 1055-6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.022. Epub 2013 Jul 18.
- 36- Paquim, A.M.C., Brett, A.M.O. Microscopia de força atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. *Química, Universidade Coimbra*, 57-68, 2003.
- 37- Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008 May;41(5):418-23. Epub 2008 Feb 20.
- 38- Prosecká E, Rampichová M, Vojtová L, Tvrdík D, Melčáková S, Juhasová J, Plencner M, Jakubová R, Jančář J, Nečas A, Kochová P, Klepáček J, Tonar Z, Amler E. Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Aug 19. doi: 10.1002/jbm.a.33189

-
- 39- Roberts TS, Drez Jr D, McCarthy W, Paine R. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon allografts. Two years result in thirty six patients. *Am J Sports Med* 1991; 19:35-41.
- 40- Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3):325-32.
- 41- Siegel, S. E Castellan JR, N.J. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Segunda edição- Artmed- Porto Alegre- 448p 2006
- 42- Song, J.J. & Ott, H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine*. 2011. XX: 1-9.
- 43- Thomas W. Gilbert,b, Tiffany L. Sellaroa,b, Stephen F. Badylaka,c, Decelularização of tissues and organs *Biomaterials* 27 (2006) 3675–3683
- 44- Wang Y, Mu YB, Miao LY, Sun HC, Li CK. Study of methods of decalcification for making united slices of tooth and affiliated periodontic tissues. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2007 Mar;42(3):150-1. Chinese.
- 45- Wilshaw, S.P., Kearney, J., Fisher, J., Ingham, E. Biocompatibility and Potencial of Acellular Human Amniotic Membrane to Support The Attachment and Proliferation. *Tissue Engineering*. 2008(14)4: 463-72.
- 46- Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone- anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 2005; 26: 7339-49.
- 47- Yu BT, Li WT, Song BQ, Wu YL. Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves. *Eur Rev Med*

Pharmacol Sci. 2013 Aug;17(16):2179-84

48- Zaccaro Scelza MF, da Silva Pierro VS, Chagas MA, da Silva LE, Scelza P. Evaluation of inflammatory response of EDTA, EDTA-T, and citric acid in animal model. J Endod. 2010 Mar;36(3):515-9. Epub 2010 Jan 25.

49- Zhao YH, Yang Q, Xia Q, Peng J, Lu SB, Guo QY, Ma XL, Xu BS, Hu YC, Zhao B, Zhang L, Wang AY, Xu WJ, Miao J, Liu Y. In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Chin Med J (Engl). 2013 Aug;126(16):3130

50- Zhu Y, Dong Z, Wejinya UC, Jin S, Ye K. Determination of mechanical properties of tissue scaffolds by atomic force microscopy nanoindentation. J Biomech. 2011 Sep 2;44(13):2356-61. Epub 2011 Jul 26.

NORMAS ADOTADAS

ISO- International Standardization Organization

ISO- Technical Committee / Scientific Committee TC 150/SC 7 / WG123

ABNT- Associação Brasileira de normas técnicas

ASTM F 2150-02 American Society Test Materials F2150/123

BIREME Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde DeCS: descritores em ciências da saúde

Disponível em <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660>.

Exe/decsserver/?Isis Script+. /cgi-bin/decsserver/decsserver

Xis&interface_language=p&previous_page=homepage&previous_task=NULL&task=star

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss. Versão Monusuário 2009. São Paulo: Objetiva; 2009.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [online]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2010 Apr; cited 2011 Jan 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.

Michaelis A. Dicionário inglês-português. 25ª ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2008.

PubMed.gov. U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Sociedade Brasileira de Anatomia. Nômina Anatômica. 5ª ed. Rio de Janeiro (BR): Medsi; 2001.

ABSTRACT

Tissue Engineering (TE) is a multidisciplinary science that aims to produce replacement organs and parts affected by trauma, degenerative diseases or agenesis. One of its goals is to produce biocompatible scaffolds for application in regenerative medicine. These structures are known as scaffolds, presenting three-dimensional shape similar to the original tissue in texture and porosity and directing the behavior of cells to be seeded. The recovery of anatomical and functional integrity of damaged tissues ensures the survival of living beings and the treatment of extensive losses is challenging. Objective: Get decellularized and demineralized teeth to make them feasible as natural scaffolds. Methods: The samples will be subjected to a treatment with demineralizing/decellularizing solutions. 4 different solutions were used (14% EDTA, 2.5% sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and 9% and one group of control (10% formaldehyde). The evolution of demineralization/decellularization was monitored for 90 days through the use of electron scanning microscopy, X-ray and photography. Samples' weights were measured each seven days to control the mineral loss. Results were subjected to statistical analysis of variance, Kruskal-Wallis test Wilcoxon and Chi-square Test. Was fixed at 0,05 or 5% rejection level of the null hypothesis.

Key words: Tissue Scaffold, Tissue Engineering, Demineralization.

APÊNDICE 1

APÊNDICE 1.

FOLHA DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO 7191 de 31/08/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PROJETO DE PESQUISA

Título: A DESMINERALIZAÇÃO / DECELULARIZAÇÃO DENTÁRIA NA CONFEÇÃO DE SCAFFOLD NATURAL

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 06368812.6.0000.5505

Pesquisador: Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 103.492

Data da Relatoria: 21/09/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Recomendações:

Conforme parecer CEP 87191 de 31/8/2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias atendidas. projeto pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@epm.br;arpmeloti@unifesp.br

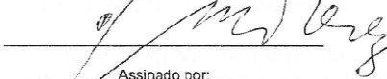
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Considerações Finais a critério do CEP:

As pendências foram atendidas, o colegiado acatou o parecer do relator. Projeto aprovado.

SAO PAULO, 21 de Setembro de 2012


Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@epm.br;arpmeletl@unifesp.br

APÊNDICE 2

APÊNDICE 2.

Tabela 7 - Medidas semanais da perda de massa durante o período de estudo.

Grupo	Dente	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12
G1	1	1.430	1.437	1.437	1.427	1.427	1.430	1.424	1.424	1.424	1.428	1.428	1.424
G1	2	1.390	1.393	1.390	1.385	1.385	1.392	1.387	1.380	1.380	1.386	1.386	1.380
G1	3	1.521	1.531	1.530	1.512	1.511	1.517	1.511	1.511	1.511	1.511	1.511	1.505
G1	4	1.394	1.394	1.394	1.394	1.391	1.394	1.392	1.388	1.388	1.389	1.384	1.388
G1	5	1.471	1.471	1.471	1.468	1.466	1.469	1.468	1.468	1.466	1.467	1.465	1.463
G1	6	1.115	1.114	1.114	1.111	1.109	1.116	1.110	1.110	1.110	1.112	1.112	1.110
G1	7	1.035	1.035	1.035	1.034	1.033	1.033	1.030	1.030	1.030	1.030	1.028	1.027
G1	8	0.873	0.872	0.872	0.873	0.870	0.870	0.869	0.869	0.869	0.869	0.869	0.869
G1	9	2.085	2.108	2.108	2.103	2.085	2.094	2.089	2.089	2.089	2.088	2.089	2.086
G1	10	1.178	1.181	1.181	1.171	1.166	1.173	1.170	1.168	1.168	1.168	1.168	1.166
G2	11	1.393	1.392	1.390	1.287	1.279	1.285	1.204	1.200	1.196	1.190	1.182	1.178
G2	12	1.291	1.290	1.253	1.203	1.192	1.196	1.128	1.126	1.124	1.120	1.111	1.105
G2	13	1.542	1.536	1.492	1.447	1.437	1.437	1.350	1.346	1.342	1.336	1.327	1.320
G2	14	1.456	1.456	1.134	1.340	1.335	1.341	1.260	1.259	1.255	1.253	1.247	1.240
G2	15	1.286	1.288	1.207	1.192	1.175	1.173	1.077	1.075	1.074	1.073	1.067	1.062
G2	16	1.221	1.223	1.332	1.129	1.122	1.122	1.073	1.071	1.069	1.068	1.066	1.062
G2	17	1.528	1.532	1.477	1.422	1.410	1.411	1.323	1.320	1.310	1.309	1.304	1.297
G2	18	1.447	1.345	1.296	1.247	1.239	1.240	1.171	1.170	1.169	1.168	1.160	1.156
G2	19	0.943	1.114	1.056	0.999	0.988	0.982	0.979	0.980	0.980	0.982	0.980	0.980
G2	20	1.458	1.331	1.276	1.222	1.215	1.216	1.147	1.146	1.145	1.145	1.137	1.134
G3	21	1.281	1.285	1.227	1.169	1.156	1.153	1.147	1.144	1.142	1.140	1.137	1.137
G3	22	1.659	1.659	1.608	1.558	1.546	1.550	1.545	1.540	1.538	1.534	1.532	1.532
G3	23	1.057	1.057	1.005	0.954	0.944	0.946	0.934	0.930	0.928	0.927	0.925	0.928
G3	24	1.323	1.322	1.277	1.232	1.226	1.228	1.218	1.216	1.214	1.210	1.206	1.206
G3	25	1.123	1.123	1.078	1.031	1.023	1.019	1.011	1.009	1.006	1.002	0.995	0.996
G3	26	1.324	1.325	1.270	1.215	1.200	1.198	1.202	1.200	1.193	1.187	1.182	1.180
G3	27	1.493	1.490	1.443	1.396	1.384	1.384	1.377	1.373	1.368	1.364	1.361	1.361
G3	28	1.798	1.800	1.745	1.691	1.682	1.682	1.679	1.670	1.620	1.659	1.654	1.656
G3	29	1.065	1.068	1.011	0.954	0.940	0.935	0.928	0.926	0.924	0.921	0.917	0.917
G3	30	1.265	1.266	1.204	1.142	1.128	1.124	1.120	1.100	1.108	1.105	1.099	1.099
G4	31	1.255	1.272	1.211	1.150	1.135	1.119	1.067	1.060	1.050	1.045	1.042	1.034
G4	32	1.345	1.349	1.289	1.230	1.219	1.215	1.142	1.140	1.135	1.131	1.121	1.118
G4	33	1.316	1.330	1.284	1.238	1.231	1.229	1.160	1.158	1.156	1.152	1.144	1.141
G4	34	1.355	1.367	1.321	1.256	1.243	1.242	1.174	1.167	1.160	1.151	1.145	1.140
G4	35	1.033	1.046	0.995	0.944	0.935	0.932	0.865	0.863	0.861	0.859	0.842	0.836
G4	36	1.385	1.391	1.340	1.289	1.277	1.273	1.193	1.187	1.181	1.174	1.167	0.834
G4	37	1.426	1.434	1.378	1.321	1.308	1.302	1.186	1.180	1.176	1.171	1.169	1.165
G4	38	1.033	1.044	0.997	0.950	0.942	0.919	0.882	0.880	0.878	0.878	0.874	0.869
G4	39	1.452	1.472	1.416	1.359	1.331	1.323	1.277	1.275	1.273	1.269	1.260	1.250
G4	40	1.334	1.135	1.071	1.006	0.989	0.985	0.899	0.897	0.895	0.894	0.884	0.878
G5	41	1.420	1.431	1.377	1.322	1.310	1.278	1.274	1.268	1.262	1.255	1.250	1.242
G5	42	1.038	1.052	0.981	0.910	0.888	0.877	0.886	0.876	0.870	0.866	0.860	0.853
G5	43	1.281	1.299	1.237	1.175	1.161	1.158	1.159	1.150	1.141	1.132	1.116	1.102
G5	44	1.407	1.412	1.338	1.263	1.251	1.247	1.249	1.241	1.233	1.224	1.212	1.200
G5	45	0.944	0.953	0.894	0.835	0.820	0.811	0.768	0.765	0.763	0.761	0.756	0.749
G5	46	0.696	0.708	0.661	0.613	0.603	0.596	0.597	0.594	0.591	0.587	0.582	0.577
G5	47	1.436	1.439	1.379	1.319	1.303	1.299	1.293	1.288	1.284	1.280	1.279	1.271
G5	48	1.343	1.359	1.290	1.221	1.191	1.168	1.164	1.161	1.158	1.154	1.149	1.111
G5	49	1.061	1.075	1.017	0.959	0.943	0.938	0.937	0.927	0.917	0.907	0.891	0.882
G5	50	0.978	0.988	0.937	0.885	0.875	0.871	0.871	0.866	0.861	0.856	0.854	0.848

om relação as

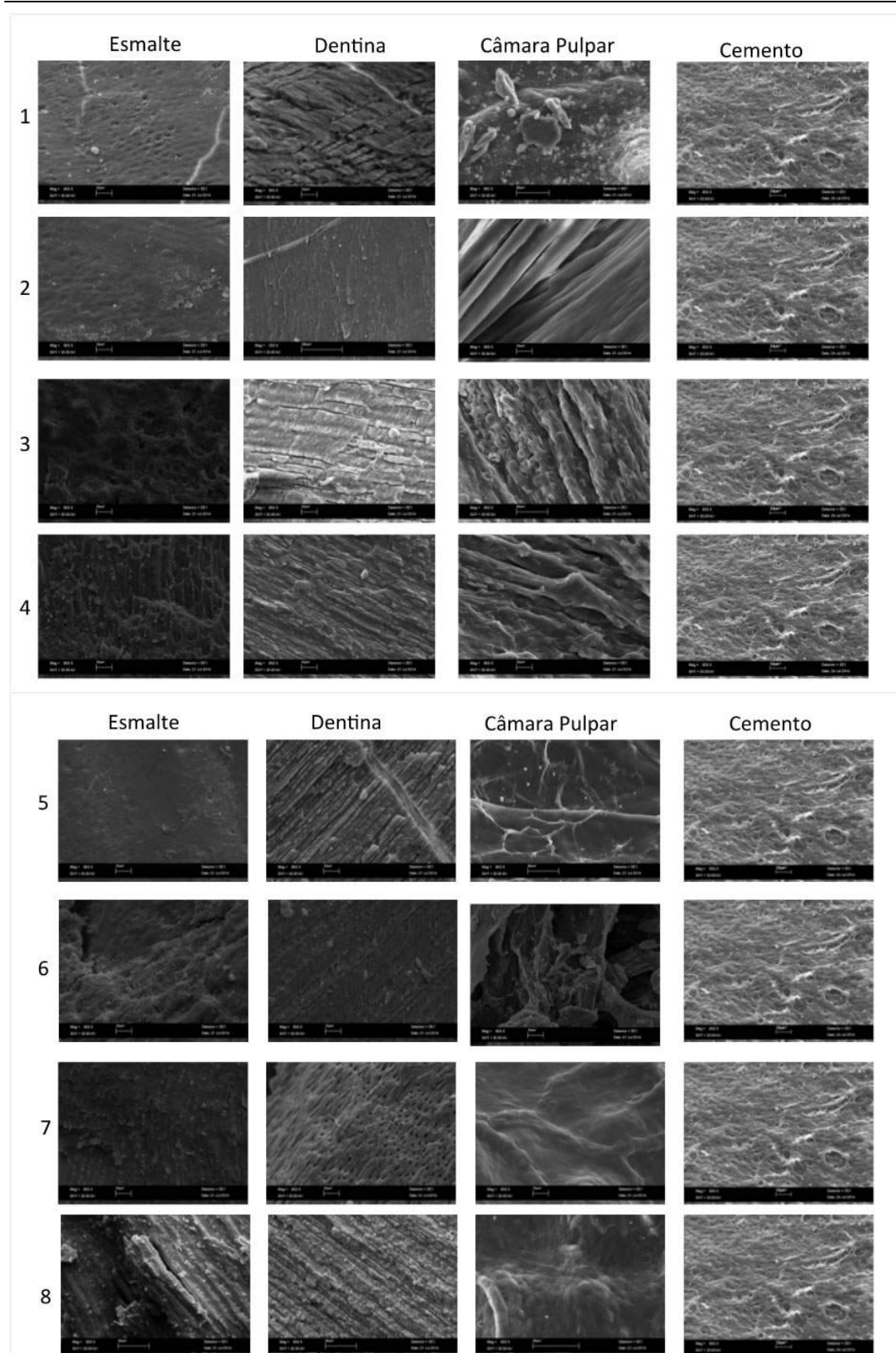
DELTA PERCENTUAL DOS VALORES DAS MASSA COM RELAÇÃO AS SEMANAS NO GRUPOS

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE FRIEDMAN
X		0,03	0,4	0,62	0,32	0,59	0,69	0,7	0,61	0,67	0,82X2	56,3127
G1	Mi	0,0000	0,25	0,5	0,2	0,45	0,7	0,7	0,5	0,65	0,85p	<0,0001
X		4,19	7,52	8,34	8,25	13,28	11,4	13,62	11,76	14,23	14,55X2	74,8691
G2	Mi	3,6	7,5	8,2	7,9	13,2	13,25	13,45	11,56	14,15	14,55p	<0,0001
X		4,06	8,1	8,97	5,03	9,53	9,93	10,34	10,36	10,68	10,64X2	85,2327
G3	Mi	4,1	8,25	9,15	5,45	9,65	9,8	10,1	10,6	11,1	11,1p	<0,0001
X		4,25	8,55	9,68	10,25	11,66	15,97	16,29	16,59	17,11	20X2	89,7927
G4	Mi	4,15	8,45	9,6	10	15,4	15,6	15,9	16,05	16,6	17,9p	<0,0001
X		5,32	10,57	12,05	12,83	13,32	13,87	14,36	14,85	15,5	16,43X2	89,46
G5	Mi	5,2	10,5	11,85	12,25	12,3	13,05	13,8	14,25	14,85	16,6p	<0,0001

Análise de Variância de Grupos Kruskal Wallis

Delta percentual G1 > G2 < G3 < G4 < G5

	Hcalc	p
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 2	29,9829	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 3	32,2814	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 4	30,5139	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 5	32,4414	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 6	32,5774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 7	32,7533	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 8	32,5774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 9	32,5774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 10	32,9144	<0,0001



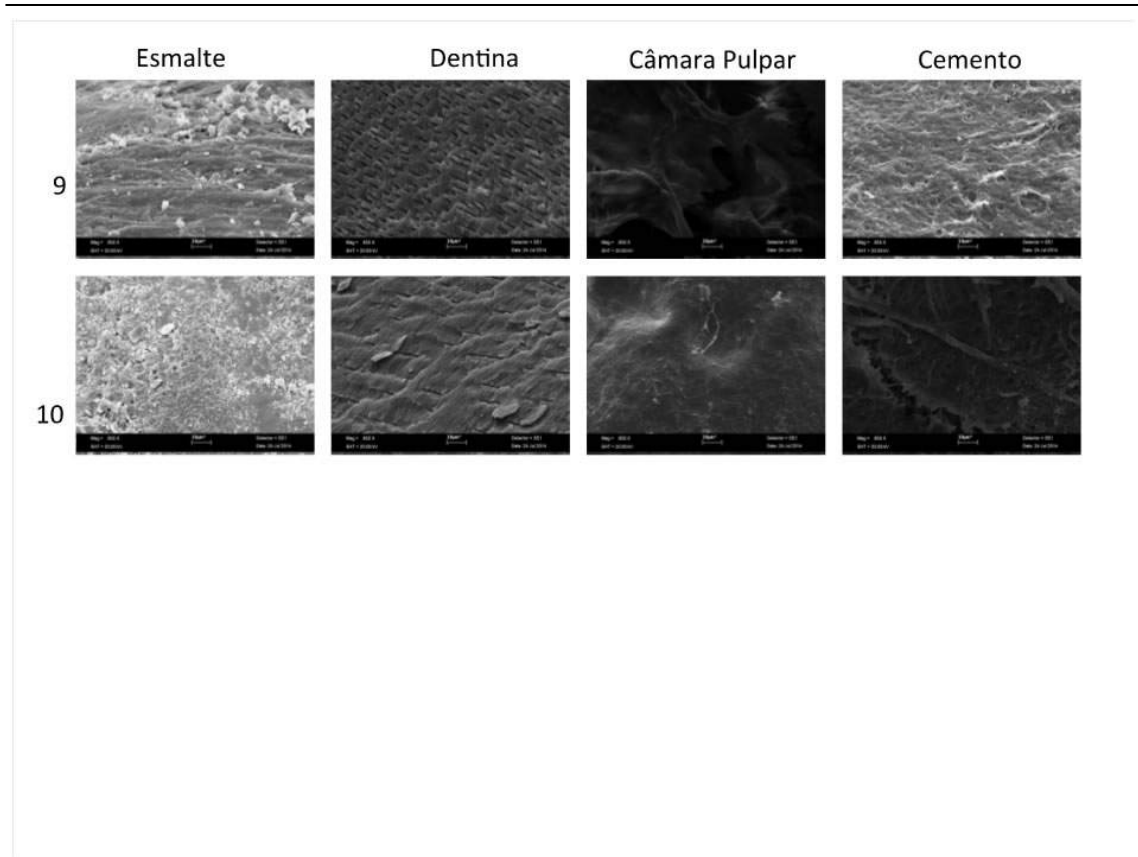
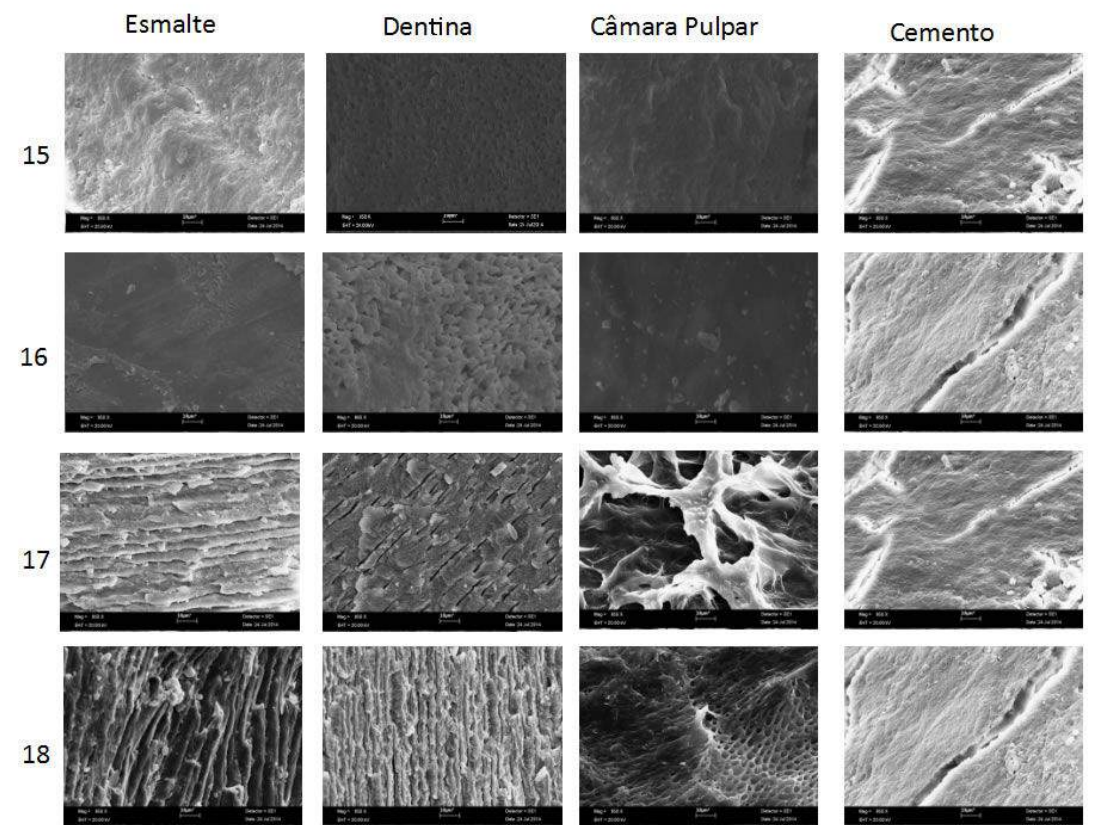
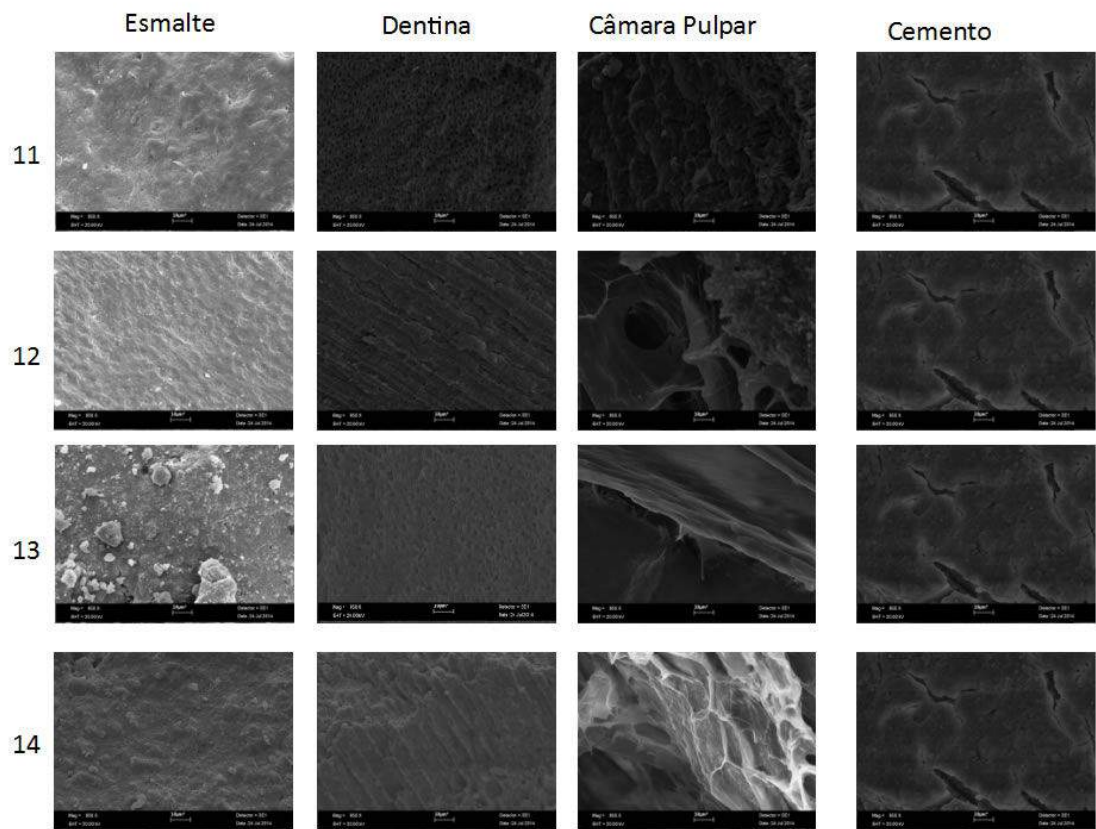


Figura 19 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura dos dentes do grupo 1(1-10) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento. 950 X, 10 μ m



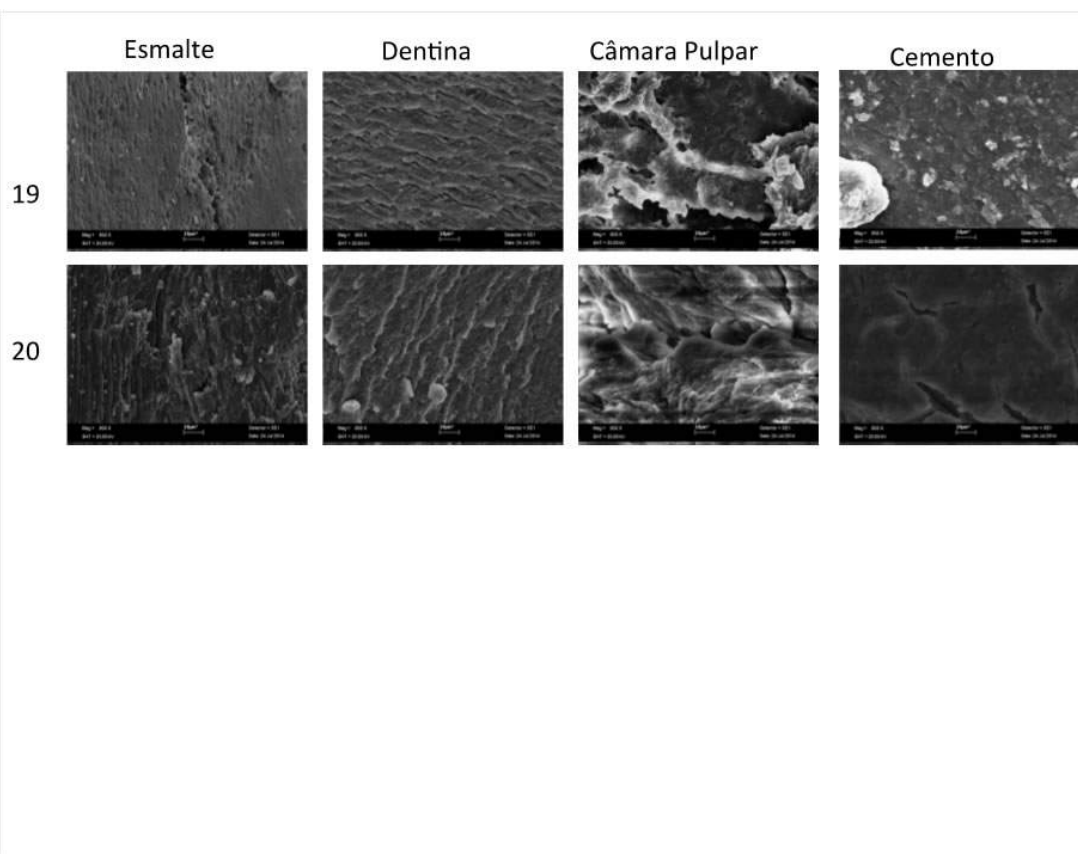
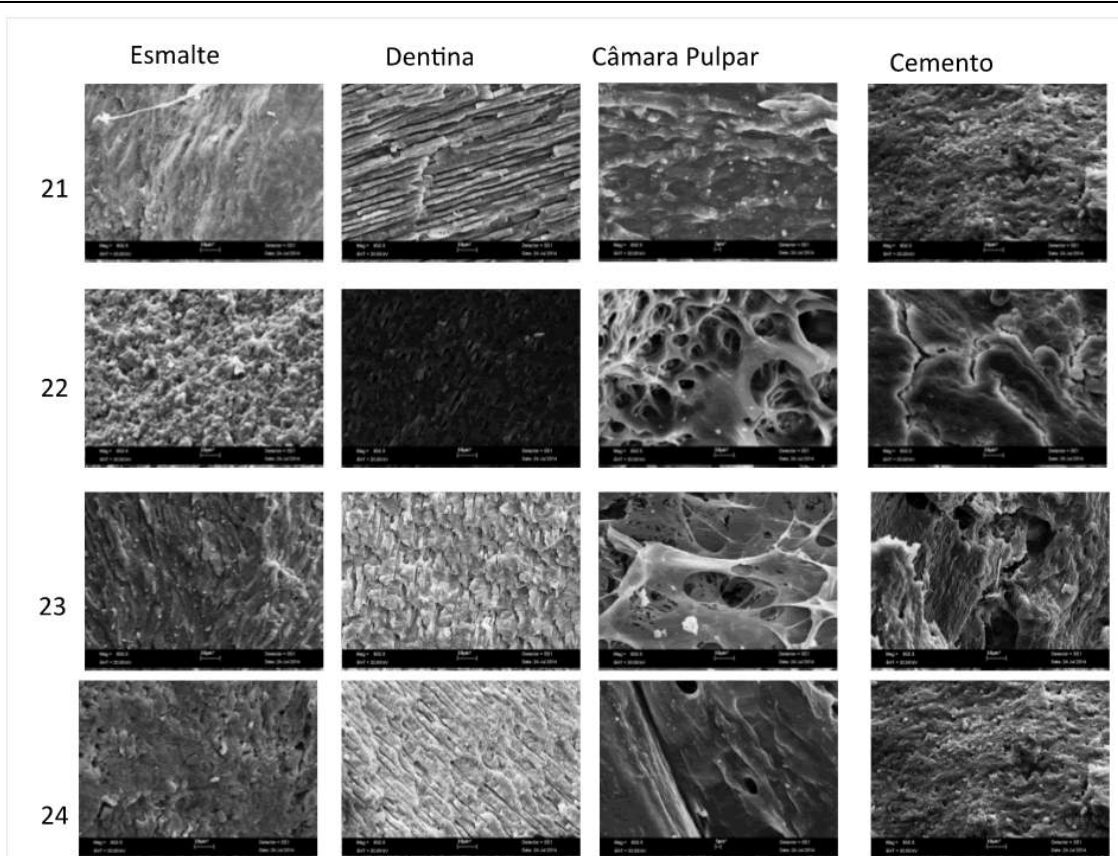
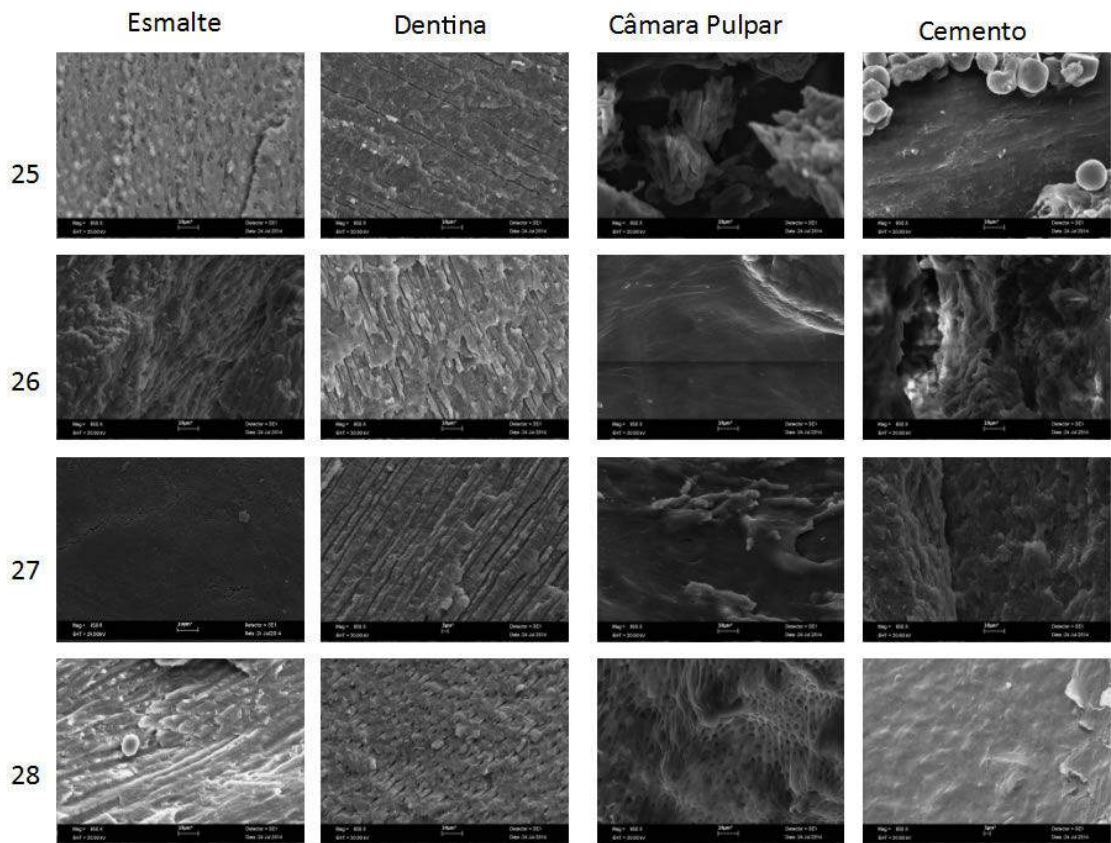


Figura 20 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura no grupo 2 (11-20), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento. 950 X, 10 µm





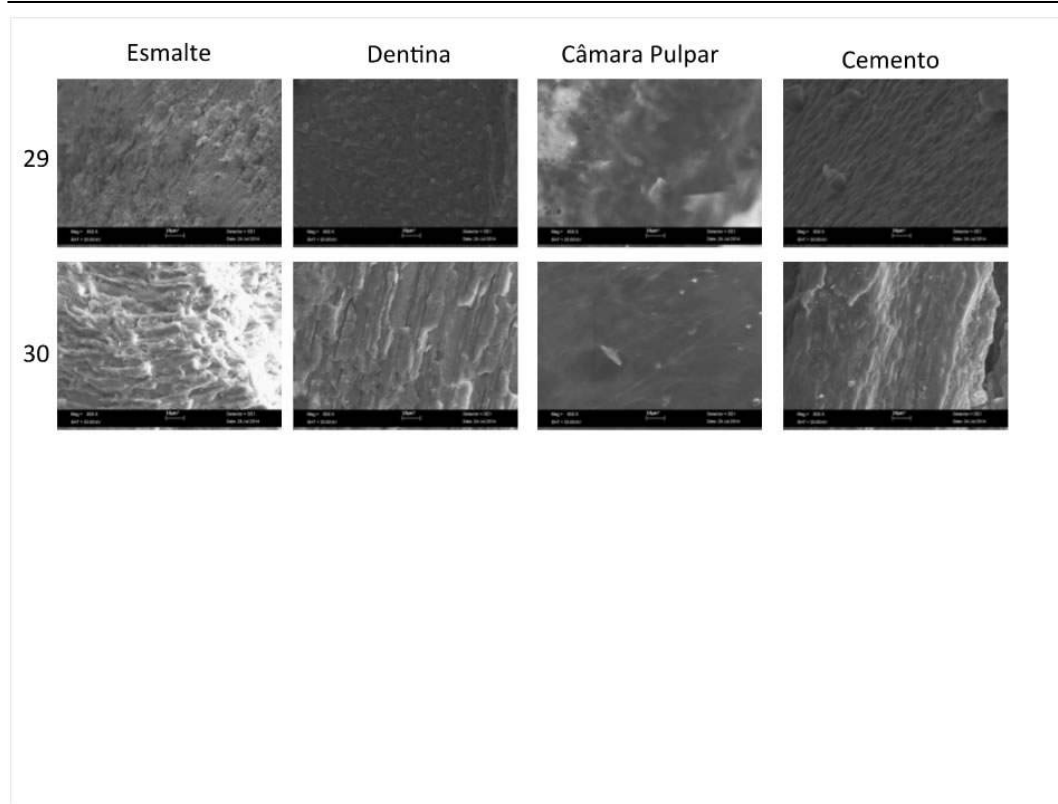
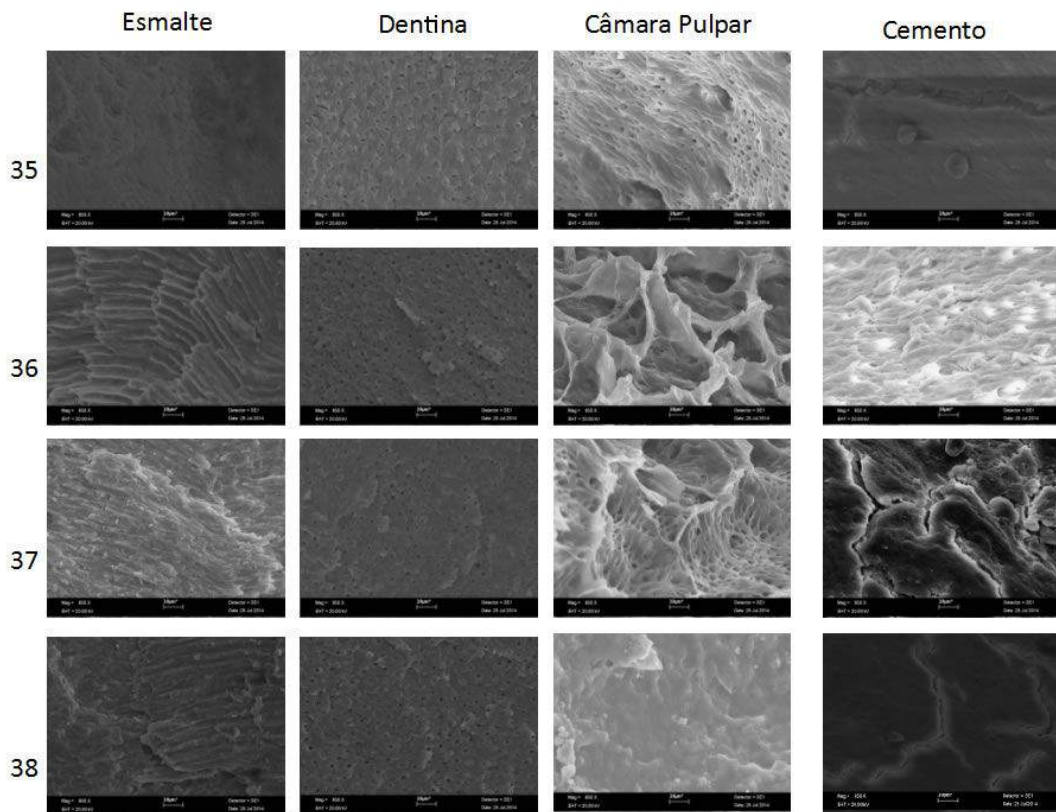
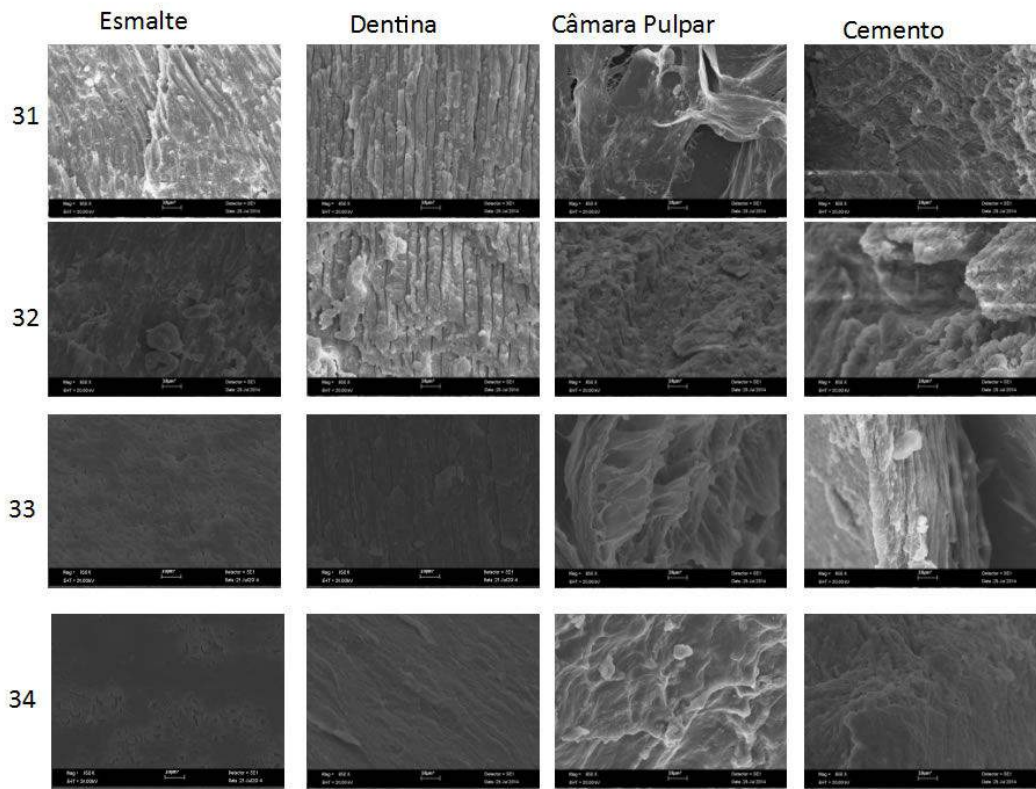


Figura 21 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura no grupo 3 (21-30), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento. 950 X, 10 μ m



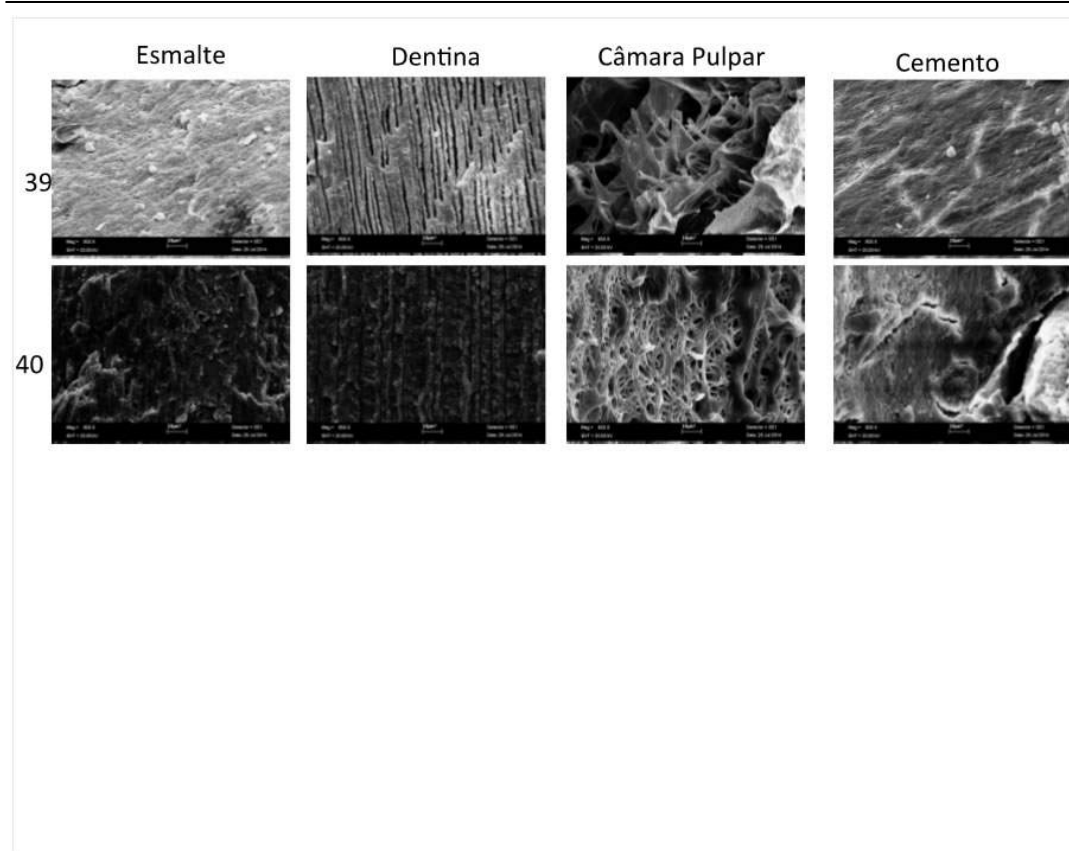
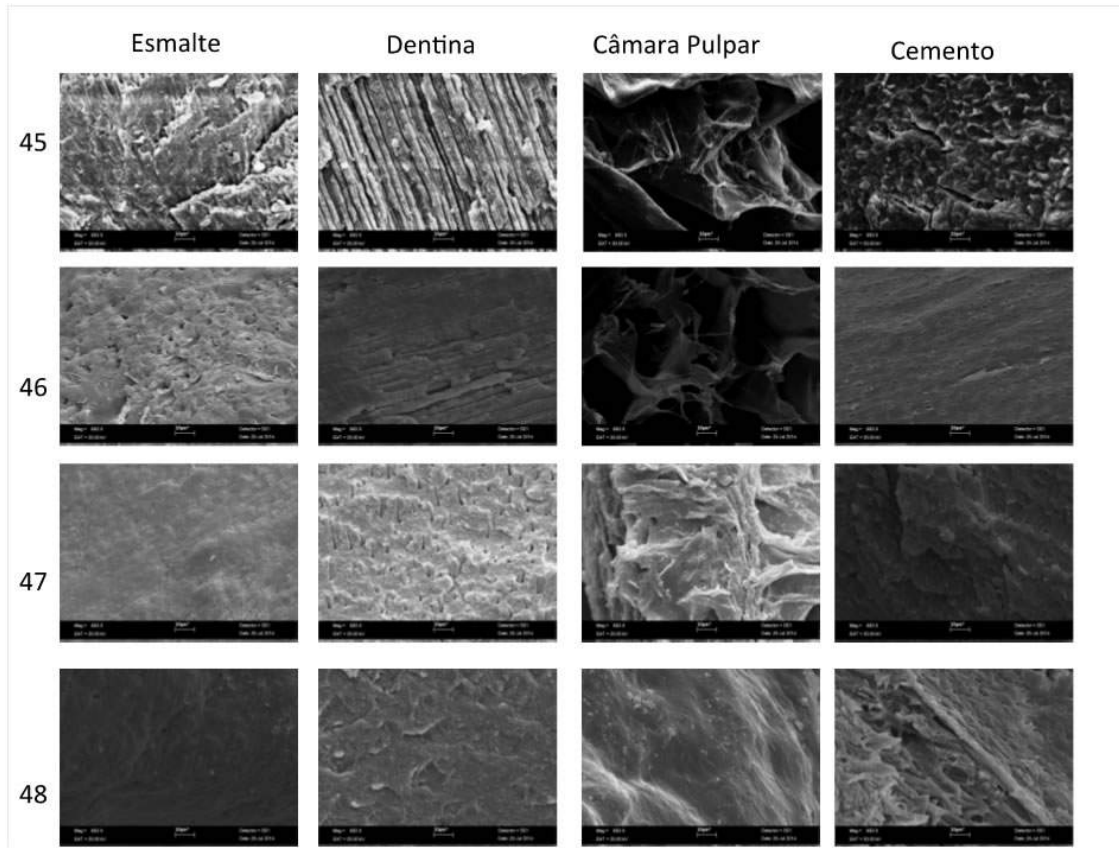
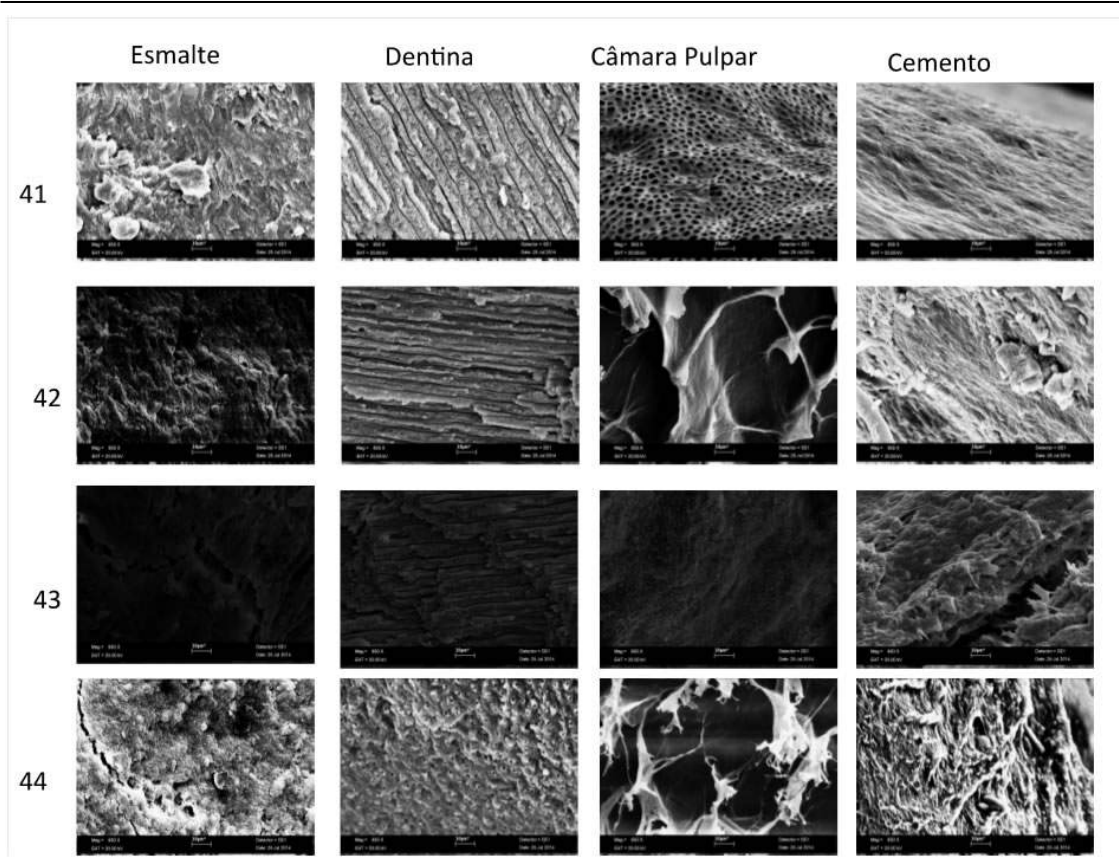


Figura 22 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura no grupo 4 (31-40), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento. 950 X, 10 µm



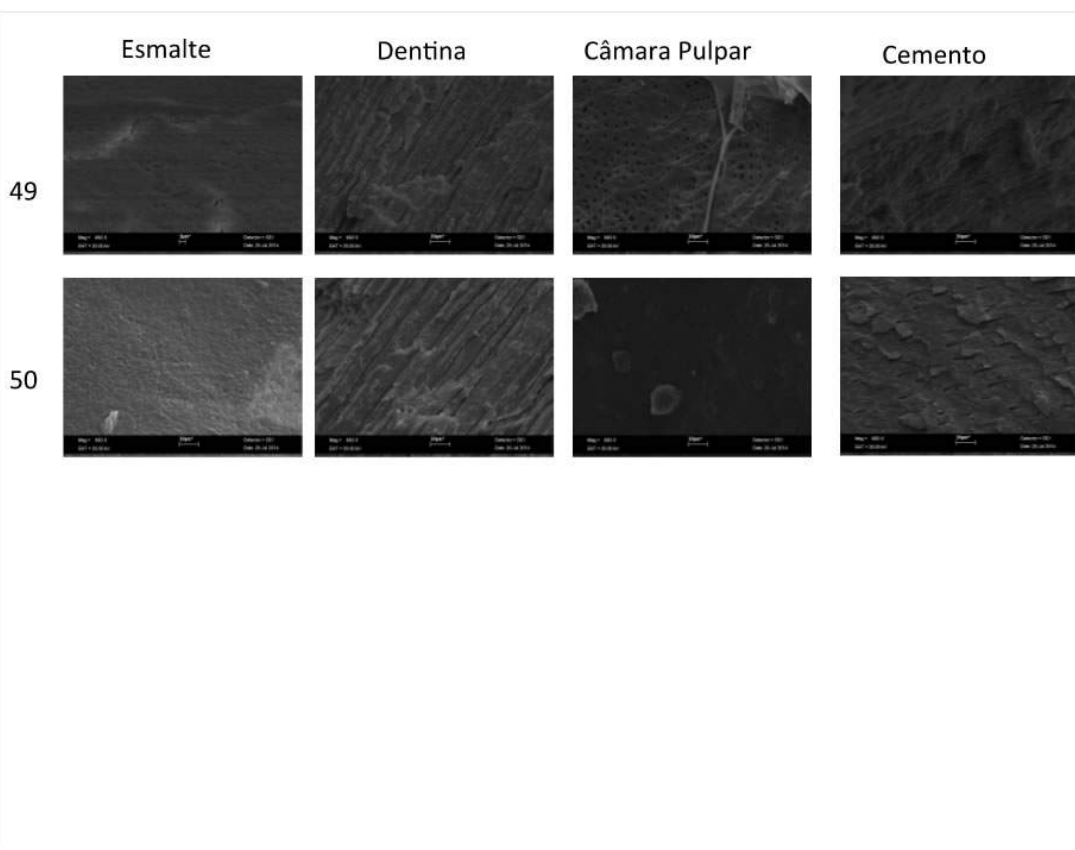


Figura 23 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura no grupo 5 (41-50), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento. 950 X, 10 µm

APÊNDICE 3

APÊNDICE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**1 – TÍTULO DA PESQUISA – A DESMINERALIZAÇÃO /
DECELULARIZAÇÃO DENTÁRIA NA CONFECÇÃO DE SCAFFOLD
NATURAL**

2 – PROPOSTA DE ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de um Estudo de Pesquisa. Antes de decidir se quer participar ou não, é importante que entenda porque o Estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Por favor, leia com atenção as informações ou peça que as mesmas sejam lidas a você pelo profissional que está apresentando. Sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos visando responder as suas dúvidas.

O objetivo desta pesquisa é estudar o desempenho de diferentes soluções desmineralizadoras / decelularizadora em dentes humanos in vitro (em laboratório), na tentativa de beneficiar a pesquisa. Para este estudo serão utilizados dentes com indicação de extração, avaliados por meio de exame clínico e radiográfico, os quais em condições normais seriam desprezados após a cirurgia. A sua participação será somente como doador do órgão dental. Os dentes serão expostos a fotografia, pesagem radiografia, e posteriormente avaliados com testes pertinentes.

3 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os pacientes incluídos neste estudo deverão concordar com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinando o protocolo clínico anexado.

Após os exames clínico e radiográfico e constatada a indicação de extração dental como único tratamento, você será submetido ao procedimento cirúrgico. Este procedimento é exatamente igual ao praticado na rotina odontológica e também seria realizado independente deste estudo.

4 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS

O procedimento cirúrgico consistirá na extração dentária e você poderá ser medicado com anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e analgésicos de acordo com as rotinas e necessidades clínicas pré e pós-operatórias de cirurgias de dentes.

5 - RISCOS E DESCONFORTO

Os riscos e desconfortos diretos ou indiretos nos procedimentos de extração dentária ocorrerão independentemente da sua participação nesta pesquisa. Os riscos e desconfortos poderão ser:

Anestesia local durante a cirurgia: dor da punção na anestesia; sensação de amortecimento na região; pressão, vibração.

No pós operatório: inchaço; dor; limitação de movimento; dor na articulação da boca; mal gosto e febre.

Todos os itens descritos são os mesmos observados em procedimentos semelhantes à extração dental de dentes inclusos. Você não deverá deixar de informar ao profissional a respeito de quaisquer dúvida ou sintomas que observar telefonando imediatamente ao profissional

responsável pelo estudo, o qual estará disponível para ouvi-lo e esclarecer suas dúvidas e perguntas.

6 - BENEFÍCIOS

Esta é uma pesquisa experimental com a finalidade de verificar o comportamento *in vitro* (em laboratório) de soluções desmineralizadoras/ decelularizadora em dentes integros. Este protocolo de estudo não lhe trará benefícios diretos mas, ajudará a reunir informações importantes e valiosas que poderão nortear novas pesquisas e no futuro ajudar outras pessoas. Somente no final deste estudo poderemos concluir a presença de benefícios e o quanto úteis eles poderão ser.

7 - ALTERNATIVAS DE PROCEDIMENTO

Caso você opte por não participar deste Protocolo de Pesquisa não doando o dente, o profissional responsável dispensará o mesmo jogando-o no lixo contaminado.

8 - GARANTIA DE ACESSO

Você terá acesso a todo e qualquer destino dado aos dentes utilizados e/ou estocados, além dos resultados obtidos com este estudo, garantimos que em qualquer etapa, você poderá esclarecer suas eventuais dúvidas com os profissionais responsáveis pela pesquisa. Os principais investigadores são Profs. Drs. Silvio Eduardo Duailibi e Monica Talarico Duailibi que podem ser encontrados no seguinte endereço: Av. Chibarás, 452 e no telefone 011- 5051 1898. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

9 – PARTICIPAÇÃO

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Sua participação no estudo é voluntária. Se preferir não participar, não há necessidade de nenhuma justificativa.

10 - CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários. Tanto o profissional responsável quanto a equipe envolvida, manterão em sigilo absoluto sua identidade e as informações que você vier a apresentar. Você não será identificado em nenhuma publicação onde o conteúdo do trabalho seja apresentado, garantindo o segredo profissional.

11 – ATUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, após a sua extração. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional no

estudo, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – COMPROMISSO

Os pesquisadores assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo A DESMINERALIZAÇÃO / DECELULARIZAÇÃO DENTÁRIA NA CONFECÇÃO DE SCAFFOLD NATURAL. Eu discuti com o Dr. Silvio Eduardo Duailibi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/___

Assinatura da Testemunha

Data: ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo Data: ___/___/___

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE DEZOITO ANOS

Meu nome é Luciana Aparecida Sousa Iwamoto e o meu trabalho é pesquisar a desmineralização/decelularização dentária para ver qual solução a deixa mais limpinha em laboratório. Queremos melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes e achamos que esta pesquisa pode ajudar nisso. Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não, é você quem decide. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei.

Queremos achar melhores maneiras para tratar doenças causadas por acidentes e precisamos testar os dentes para tentar torna-los acessíveis no

futuro. Estamos testando dentes de crianças/adolescentes e adultos nesta pesquisa.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Se decidir não participar da pesquisa, nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim, este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

A sua saúde é muito importante e você veio ao dentista para tratá-la. O seu dente precisa ser arrancado mesmo que você decida não participar desta pesquisa. Para participar desta pesquisa você deve doar o seu dente que seria jogado no lixo, e só assim poderemos utilizá-lo em laboratório.

O uso do dente em laboratório é seguro e já foi testado em outras crianças e adolescentes. Não houve nada que nos preocupasse. Porém, se qualquer coisa incomum acontecer a você, você deverá se sentir à vontade de nos chamar a qualquer momento para falar sobre suas preocupações ou perguntas. Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. Talvez você sinta dor depois que o seu dente for arrancado, mas isso é passageiro e não tem nada a ver com este estudo.

A sua participação nesta pesquisa é muito importante para melhorar o tratamento de doenças causadas por acidentes. Isto irá ajudar muitas pessoas agora ou mais tarde.

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não comunicaremos informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa.

Eu entendi que a pesquisa é sobre um teste nutrientes em células de dente feito em laboratório. Eu entendi que o meu dente precisa ser arrancado mesmo que eu não queira participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/_____

Assinatura dos Pais ou Responsável

Data: ___/___/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo Estudo

Data: ___/___/_____

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. *Acta Cir Bras* [serial online] 2005;20 Suppl. 2:02-9. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci_arttext.

Nahas FX, Ferreira LM. A arte de redigir um trabalho científico [online]. *Acta Cir Bras*. 2005;20(2):17-8. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502005000800005.