

LUCIANA APARECIDA DE SOUSA IWAMOTO

**MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO PARA *SCAFFOLD*
NATURAL USADO EM ENGENHARIA TECIDUAL**

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

**SÃO PAULO
2019**

LUCIANA APARECIDA DE SOUSA IWAMOTO

**MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO PARA *SCAFFOLD*
NATURAL USADO EM ENGENHARIA TECIDUAL**

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

ORIENTADOR: Prof. Silvio Eduardo Duailibi

COORIENTADORA: Prof^ª. Monica Talarico Duailibi

Prof^ª. Debora Cristina de Oliveira

**SÃO PAULO
2019**

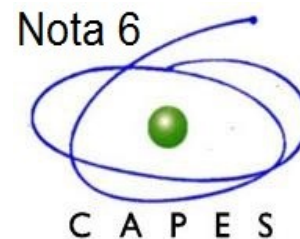
Iwamoto, Luciana Aparecida de Sousa.

Métodos de esterilização para *scaffold* natural usado em Engenharia Tecidual. / Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto.-- São Paulo, 2019.
XVII, 144f.

Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós- Graduação em Cirurgia Translacional.

Titulo em inglês: Sterilization methods for natural scaffold used in Tissue Engineering

1. Engenharia tecidual. 2. Medicina Regenerativa 3.Desmineralização do dente 4. Desmineralização 5. Esterilização 6. Tecido Suporte



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

TRANSLACIONAL

COORDENADORA: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR: Prof. Silvio Eduardo Duailibi

COORIENTADORES: Prof^{as}. Monica Talarico Duailibi

Prof^a. Debora Cristina de Oliveira

2019

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

ELE que tem sempre um propósito maior 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 críticas 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 rendimento escolar.

À toda equipe do laboratório de Engenharia tecidual e Biofabricação
do CTCMOL, UNIFESP.

Às minhas secretárias RUBERVÂNIA ALVES BATISTA,
ANDREIA DE CASSIA CHIARI , 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 CAPES pelo incentivo e apoio financeiro.

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 PROFª. MONICA TALARICO DUAILIBI, que com muita dedicação e exigências desempenhou sua função com sabedoria.

À minha coorientadora PROFª. DEBORA CRISTINA DE OLIVEIRA pelo comprometimento, dedicação e contribuição, e suas palavras de incentivo.

Meus sinceros agradecimentos.

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, pela oportunidade de estar aqui, junto a estes profissionais que admiro e respeito.

Ao **PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**, ex coordenador do Programa de Pós Graduação em cirurgia translacional, pelo apoio e incentivo aos docentes e alunos, sempre nos tratando com muita gentileza.

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.

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

Às minhas colegas de turma que foram essenciais para minha formação em especial **NATASHA MACHADO, RANI CUNHA**

MORETTI, JENNIFER ADRIANE DOS SANTOS, VANESSA PENNA, LUCIANA LOPES, MARCIA ALVES, ERIC MOTA, LUCIANA FERNANDES, SAMARA RIBEIRO, FERNANDA LADIM, PAULO OLIVEIRA MARTINS, RENATO DALCIM.

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

Ao Laboratório 3 M com o **PROF. DR ROGERIO DE ALMEIDA VIEIRA** e seu aluno **GERSON YOSHINOBU IWAMOTO** que contribuiu inúmeras vezes nos programas de análise Topas, Origin, análises estatísticas, por sua ajuda e disposição para ensinar. O manuseio do equipamento de microdureza à **JULIANA SARANGO DE SOUZA.**

Ao Laboratório de Engenharia e controle ambiental da **PROFESSORA DRA CRISTIANE ARRUDA RODRIGUES** que disponibilizou o equipamento de caracterização das amostras por difração de raio X (DRX), sob orientação e treinamento do aluno de doutorado **GERSON YOSHINOBU IWWAMOTO** no Campus Diadema da UNIFESP.

A **FATEC** a disposição do Professor **DAVINSON MARIANO DA SILVA** e do Professor **SILVANO LEAL DOS SANTOS** na utilização do FRX e DRX, auxiliando e colaborando com as análises.

AO **IPEN**, instituto de pesquisas nucleares na Universidade de São Paulo, pela colaboração e disponibilização do aparelho multipropósito ^{60}CO .

A **ACECIL** pela colaboração e disponibilização da esterilização com óxido de etileno.

A PROF^a. **DÉBORA DE OLIVEIRA** e ao PROF. **FELIPE REBELLO LOURENÇO** do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo auxílio com o teste de esterilidade.

Enquanto o sonho da Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual existir a luta deve continuar, mesmo diante de tantos obstáculos, um passo de cada vez rumo a superação. Para que um dia, se for do merecimento da humanidade e da vontade Divina seja possível a construção de órgãos efetivamente.

Luciana Ap Sousa Iwamoto

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA-----	V
AGRADECIMENTOS-----	VI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XV
GLOSSÁRIO	XVII
RESUMO	XIX
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	7
3. LITERATURA	9
4. MÉTODOS	34
5. RESULTADOS.....	59
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	85
8. REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE 1.....	101
APÊNDICE 2.....	105
APÊNDICE 3.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas semanais da perda de massa durante o período de estudo. ... 105

Tabela 2 – Kruskal-Wallis – $\Delta\%$ da massa das amostras 106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do método	37
Figura 2 - Dispositivo para tomada de radiografia, tempo de exposição do rx de 30 segundos	39
Figura 3 – a-Escalímetro de alumínio para padronização de tons de cinza; b- película radiográfica e pode comparar a radiopacidade/radiolucidez das amostras	39
Figura 4 - Colorímetro Chroma Meter CR-400- Konica Minolta Camera Co. Osaka, Japão	40
Figura 5 - Estufa, com termômetro coadjuvante para controle da temperatura.....	41
Figura 6 - Autoclave equipamento para esterilizar por calor úmido	42
Figura 7 - Camara de óxido de etileno	44
Figura 8 – Irradiador Multipropósito de ⁶⁰ Co.....	45
Figura 9 - a- Capela de fluxo laminar classe II tipo A; b- tubos do ensaio com as amostras; c- Incubadora	47
Figura 10 - Dentes seccionados longitudinalmente após receberem ouro coloidal, antes de serem observados em MEV	48
Figura 11 - Metalizador de amostras	48
Figura 12 - EDS e MEV, Evo Ma 15 Zeiss: a- metalizador de amostra com fita de carbono; b- porta amostra metalizada; c- Camara de entrada de MEV; d- Imagem do interior do MEV com amostras em posição.....	51
Figura 13 - Aparelho da Bruker, o FRX S2 Ranger é utilizado para identificar composição de amostras sólidas e prepare de porta amostras para FRX: a- FRX S2 Ranger; b- Porta amostras.	52
Figura 14 – Difrátômetro de Raios X: a- Amostra; b- preparo da amostra em almofariz cerâmico; c- grânulos finos; d- porta amostra; e- ajuste do porta amostra; f- inserção no DRX da amostra, Bruker AXS.....	54
Figura 15 -- Microdurometro HMV 2T Shimadzu.....	55
Figura 16- Registro do resultado do teste de esterilidade (*)	59
Figura 17 - Percentual quanto a perda de massa (*)	60
Figura 18 - Tabela da perda de massa antes e após o processo de esterilização.....	61
Figura 19 - Tabela da microdureza após o processo de esterilização.....	62
Figura 20 - Fotografia e Radiografia das amostras de dentes pré molares antes e após o processo de desmineralização e descelularização, e esterilizados.....	63
Figura 21 - Fotografia das amostra de dentes pré molares após o processo de desmineralização, descelularização e respectiva esterilização: a- Amostra em formol controle; b- Amostra descelularizada controle; c-Amostra descelularizada e esterilizada submetida à Calor Seco; d-Amostra descelularizada e esterilizada submetida à Radiação Gama; e-Amostra	

Lista de Figuras

descelularizada e esterilizada submetida à ETO; f- Amostra descelularizada e esterilizada submetida à Calor Úmido.	64
Figura 22 – Histologia das amostras de dentes pré-molares após esterilização	65
Figura 23 - Imagem de EDS após o processo de descelularização, desmineralização e esterilização.	66
Figura 24 - FRX após o processo de descelularização, desmineralização e esterilização, avaliando a quantidade de calcio e fósforo.	67
Figura 25 - MEV comparativa após o processo de esterilização	68
Figura 26 - Representa a disposição dos átomos na estrutura cristalina da célula unitária da hidroxiapatita, Mavropoulos (1999) cita como fonte Kay et all (1964).	69
Figura 27 – estrutura da célula unitária da hidroxiapatita (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	69
Figura 28 - Padrões de difração de raios X da amostra 50 submetida ao tratamento de descelularização, uma comparação dos ângulos equivalentes dos principais picos cristalográficos provenientes do arquivo CIF (<i>Crystallographic International File</i>), utilizados no refinamento pelo método Rietveld da amostra 50 descelularizada, através do software Topas.	70
Figura 29 – Comparativo dos difratogramas de raios X do grupo dos discos da amostra 50 - apenas descelularizado; 50a - submetida ao processo de esterilização em calor seco; 50b – submetida ao calor úmido; 50c – submetida à radiação gama; e 50d – submetida ao óxido de etileno; além dos ângulos correspondentes da posição dos átomos e seus respectivos planos cristalográficos.	71
Figura 30 - Colorimetria	72
Figura 31 - Imagem de contaminação obtida através de microscopia eletrônica de varredura.	72
Figura 32 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo calor seco, GD1 (51-60) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	107
Figura 33 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo calor úmido, GD2 (61-70) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	108
Figura 34 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo óxido de etileno, GD3 (71-80) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	109
Figura 35 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo controle descelularizado, GD4 (81-90) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	110
Figura 36 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo radiação gama, GD5 (91-100) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.	111

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 Desoxirribonucleico
- 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

N- Newton

MPa - megapascal

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

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, pois essa reposição no ser humano necessita estar estéril. **Objetivo:** Avaliar a eficiência da esterilização após a desmineralização e descelularização dos dentes viabilizando-os como *scaffolds* naturais. **Método:** As amostras foram submetidas a um tratamento com soluções desmineralizadoras/descelularizadoras e esterilizados. Foram usados: EDTA 28% para desmineralização, peróxido de hidrogênio 9%, detergente enzimático, em todos os grupos experimentais; G0- controle formol, , G1- esterilização com calor seco, G2-esterilização com calor úmido, G3- esterilização com óxido de etileno, G4- controle/descelularizados, G5-esterilização por radiação Gama. A distribuição se deu dessa forma por ter sido aleatorizada. 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. A esterilização recebeu o teste de esterilidade, colorimetria, microdureza, DRX, EDS, FRX e MEV. Os

resultados receberam análise estatística de variância de Friedman, Kruskal-Wallis, Teste do Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. Foi fixado em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. **Conclusão:** A desmineralização / descelularização mostrou eficiente limpeza prévia ao processo de esterilização, mesmo não sendo capaz de eliminar todos os microrganismos, já os métodos de esterilização avaliados mostraram-se eficientes, porém algumas alterações no *bioscaffold* indicaram que ocorreram alterações de coloração e dureza.

Palavras chave: Tissue Engineering, Engenharia Tecidual, Desmineralização.

ABSTRACT

Tissue Engineering (TE) is a multidisciplinary science dedicated to producing organs and human parts replaced by traumatic lesions, degenerative diseases or agenesis. One of its stages is the production of biocompatible frameworks for application in Regenerative Medicine. These structures are known as scaffolds, they are similar to the original tissue in texture and porosity. Moreover, it drives the behavior of the cells that will be sown, leading to a construct. The treatment of extensive losses is very difficult and challenging, as the complete recovery of the anatomical and functional integrity of damaged tissues not only provides physical and psychological improvement but also can mean the survival of the patients. The use of natural scaffolds involves the removal of living cells from the organ/tissue and let it read to be implanted in humans, and its biosafety implies being sterile, and with its macro and micro-geometry preserved. Objective: Evaluate the efficiency of sterilization after demineralization and decellularization of the teeth, enabling them as natural scaffolds. Methods: The samples were submitted to demineralizing/decellularising solutions in sequence sterilizing them. All of them were processed with 28% EDTA, 9% hydrogen peroxide, enzymatic detergent; they were divided into 5 groups: G1 - control, G2 - sterilization with dry heat, G3 - sterilization with autoclave, G4 - sterilization with ethylene oxide; G5 - sterilization with Gamma radiation. The evolution of demineralization and decellularization was accompanied by weighing, analytical techniques SEM (Scanning Electron Microscopy), optical images and radiography. Samples were weighed before and after the sterilization process. The sterility test evaluation were performed to evaluate the microbial growth. The results were statistically analyzed by Friedman, Kruskal-Wallis, Qui-

square test and Fisher's exact test. The level of rejection of the null hypothesis was set at 0.05 or 5%. The presented results indicates all the 4 sterilization methods presented equivalent good performance, radiographically there were no evident advantage for any of them. At groups G2 and G4 the color of the samples did not change, while in group G3 the root portion became yellowish and in G5 the coronary portion became greyed. In G5, the microhardness test presented lower levels. Conclusion: Although the demineralization/decellularization processes are not sufficient to eliminate all microorganisms present in the evaluated samples, the sterilization processes performed have been shown to be effective in eliminating the bioburden.

Key words: Tissue Scaffold, Tissue Engineering, Demineralization.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é a interação entre os princípios biológicos com as técnicas de engenharia. O objetivo desta interação consiste em reparar danos causados ao organismo por doença, senilidade, traumas, agenesias, perdas de órgãos e/ou tecidos. O uso do substituto biológico no restabelecimento do equilíbrio anatomo funcional encontra-se amplamente difundido no contexto científico atual. O reparo de funções orgânicas através do uso de células constitui o maior desafio da medicina regenerativa e, de acordo com diversos autores, o substituto ideal deve ser de origem autóloga (LANGER & VACANTI, 1993; DUAİLİBİ *et al.* 2011).

Sendo a ET um campo de estudo que abrange diversas áreas do conhecimento, procuramos um substituto biológico natural para o restabelecimento do equilíbrio funcional que apresente maior compatibilidade com o organismo.

O substituto ideal é de origem autóloga, por não apresentar reação imunológica. (LANGER & VACANTI, 1993).

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* para cultura de células de germes dentários representa uma proposta da ET. (DUAİLİBİ *et al.*, 2004).

O *scaffold* natural caracteriza-se por um arcabouço biológico onde as células possam ser semeadas com a finalidade de tornarem-se estruturalmente unidas, formando um combinado, e assim gerando os produtos médicos para a saúde, TEMP's. (IWAMOTO *et al.* 2015).

A descelularização de órgãos e tecidos é bastante utilizada em ET. A eficiência na remoção das células, depende da origem do tecido e dos métodos utilizados para que ocorra esse processo. Muitos métodos apenas desvitalizam as células. As condições ideais para o uso destes tecidos incluem a mínima interferência na composição bioquímica, ultra-estrutura do tecido e o comportamento mecânico da matrix extra celular (MEC). (GILBERT *et al.*, 2006, IWAMOTO *et al.* 2015)

A esterilização é definida como a eliminação de microorganismos como bactérias, esporos, protozoários, fungos e vírus, essenciais para atingir um nível aceitável de segurança (RUTALA, 1995). Calor úmido saturado sob pressão, irradiação ionizante, calor seco, óxido de etileno, ácido peracético, ácido plasma-peracético, formaldeído e vapor de formaldeído são os métodos de esterilização mais comuns (HIGASKINO, FIGEL, YAMADA, 2007). A esterilização é uma etapa chave no processamento de biomateriais, onde infecções devem ser evitadas, visto que poderiam acarretar problemas de natureza simples ou complexa, podendo levar o paciente à morte (DONLAN *et al.*, 2004).

A escolha do processo de esterilização depende da natureza do artigo a ser esterilizado. O que oferece maior segurança é o calor úmido saturado sob pressão, entretanto, vários materiais hospitalares são termossensíveis, o que inviabiliza de forma generalizada o emprego de tal método (HIGASKINO, FIGEL, YAMADA 2007). O calor seco, por fazer uso de temperaturas elevadas, pode promover a hidrólise e/ou fusão da matriz,

comprometendo a biocompatibilidade. A esterilização química gasosa por óxido de etileno tem como vantagem propiciar tratamento eficaz a temperaturas relativamente baixas, porém, os resíduos do gás, por serem agentes alquilantes, podem reagir provocando alterações das propriedades, comprometendo o biomaterial (AZEVEDO, 2006).

A reação do hospedeiro frente a um corpo estranho, que induz uma resposta inflamatória ou uma rejeição imune e imediata, é razão para buscar *scaffolds* natural biológico provenientes da descelularização de tecidos e órgãos, e a conservação dos componentes da MEC são bem tolerados pelos receptores xenogênicos (BERNARD *et al.*, 1993), e conseguindo um *scaffold* natural, este deve sofrer um processo de esterilização adequado para ser implantado no indivíduo.

O protocolo de desmineralização e descelularização utilizado que obteve melhor performance foi a utilização de EDTA associado a peróxido de hidrogênio a 9% e detergente enzimático. (IWAMOTO *et al* 2015) Após a descelularização, todos os produtos químicos residuais devem ser removidos, a fim de evitar uma resposta inflamatória no hospedeiro. (GILBERT *et al.*, 2006). Além de ser esterilizados para poder ser implantado no ser vivo.

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

Muitos são os mecanismos de desmineralizar, descelularizar e esterilizar 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 utilizá-lo como *scaffold* natural biológico, e sua utilização dependerá de um processo eficiente e estéril para viabilizar seu uso em ET.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a eficácia de métodos de esterilização para os *scaffolds* naturais.

LITERATURA

3. LITERATURA

EMANS *et al.* (2005) estudaram os efeitos de diferentes protocolos de descalcificação de cartilagens com marcadores em geral, mencionou que a apoptose é caracterizada por rupturas 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 hidróclorito comercial, para marcar toda a cartilagem e realizar a análise. E concluíram que os efeitos da proteinase K na preservação do núcleo foram adversos e que a descalcificação com EDTA de 10% deu o melhor resultado, sendo que o DNA de Condrócitos mantinha-se intacto após o uso deste reagente. A descalcificação com EDTA de 10% é o método mais seguro de descalcificação se a análise de TUNEL for aplicado à cartilagem.

GILBERT *et al.* (2006) relataram que os tecidos e os órgãos descelularizados tem sido usados com sucesso em ET 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.

Concluíram que 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 comparar os métodos de descalcificação para fazer com que o dente e os tecidos periodontais se tornassem fatias estruturalmente unidas, estudaram 21 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 de descalcificação 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 concluíram que a solução do formol de 50% que contém o cloreto de alumínio foi uma solução descalcificante mais rápida e ideal para processos rápidos, mas deviasse ter cautela pois houve perda de forma.

BAPTISTA *et al.* (2008) estimaram que mais de 21 milhões de pessoas no mundo viviam com doença hepática crônica, e cerca de 800.000 morriam 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 continuava aumentando. A escassez de órgãos estimula a pesquisa de alternativas na doença hepática em estágio final. Terapias celulares com algum grau de sucesso são 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 representava potencialmente uma nova esperança para os pacientes que sofriam 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 foi notável e confirmava o seu potencial em

Medicina Regenerativa. Destacaram 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) avaliaram e compararam 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. Cortaram 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) avaliaram 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 unirradicular 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. Resultaram 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) como não havia um substituto valvar ideal, os homoenxertos crio preservados foram considerados uma boa opção, pelo excelente perfil hemodinâmico, baixa incidência de trombo-embolismo, resistência a infecções e durabilidade a médio prazo. Porém, estavam sujeitos à progressiva degeneração, especialmente em crianças e adultos jovens. Sua antigenicidade desencadeou uma resposta imunológica, que contribuiu para sua degeneração, calcificação e falência. Para diminuir esta antigenicidade, desenvolveram o processo de descelularização. Pela ação de detergentes e enzimas, este processo remove os componentes celulares do homoenxerto, diminuindo sua imunogenicidade e, provavelmente, retardando sua degeneração. O objetivo deste estudo, experimental e descritivo, foi analisar o comportamento histológico e funcional de homoenxertos pulmonares ovinos descelularizados (H-descel) por uma nova solução, composta principalmente de dodecil sulfato de sódio a 0,1% . Para caracterizar este comportamento, foram 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-descel em posição ortotópica, através de uma toracotomia esquerda, com auxílio de circulação extracorpórea. Os animais foram acompanhados clinicamente e por ecocardiogramas 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-descel 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. Concluíram que neste modelo experimental, os H-descel mostraram-se excelentes substitutos valvares a médio prazo.

ZACCARO *et al.* (2010), avaliaram a biocompatibilidade de agentes quelantes, dos ácidos orgânicos, e a resposta inflamatória ao EDTA, EDTA-T, e ao 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. 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) buscaram alternativas para adquirir substituto de dentes humanos, estudou as metaloproteinase (MMPs) implicadas no metabolismo do colágeno nos processos fisiológicos e patológicos da dentina humana. 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 guanidina-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 poli(acrilamida) 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. Concluíram 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) projetaram 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 desmineralizante. Um grupo de controle foi executado com as glândulas submandibulares que não foram colocadas em nenhuma solução de desmineralização. Depois que as mandíbulas foram 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. Os resultados indicaram que não houve 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), otimizaram 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 foram 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* . E concluíram que o *scaffold* perfeito 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) mostraram a MEC em 3D de múltiplos tecidos e suas variações micro estruturais poderiam direcionar comportamentos celulares diferentes. Embora o controle sobre a estrutura da MEC pudesse 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. Demonstraram 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) estudaram 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) analisaram *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 no *delivery* 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-projetados em muitos sistemas fisiológicos.

BICHARA *et al.* (2011) relataram que a reconstrução, o reparo e a regeneração da estrutura auricular externa continuam a ser um dos maiores desafios no campo da ET. Para substituir, foi necessário estudar 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 de

origem autóloga, deu forma a implantes porosos do polietileno em orelha, e é uma modalidade atual do tratamento para a reconstrução auricular. Entretanto, sobre a última década, avanços significativos foram feitos no campo da ET e da Medicina Regenerativa (MR). Uma variedade de *scaffolds* e as aproximações inovativas foram investigadas como alternativas a usar a cartilagem costal autóloga ou implantes porosos de alta densidade de polietileno. Uma revisão dos desenvolvimentos recentes com os últimos modelos de ciência foi apresentada, focalizando em *scaffolds*, fontes de células, semeando células a textura e densidades, e características mecânicas da cartilagem auricular tecido estão sendo projetadas.

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 (MEC) 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 com o objetivo de a preparar *scaffolds* com nanofibras de poliuretano com cloreto de cálcio (CaCl₂) preparado através do processo eletro-*spilin* 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 demonstrando um efeito não-tóxicos para fixação das células.

GARLLER *et al.* (2011) estabeleceram uma estratégias para engenharia tecidual, a escolha de um *scaffold* apropriado foi 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. Os estudos 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 mostraram a formação de um tecido conjuntivo frágil, de conexão com a dentina recentemente gerada. Para a ET o conjunto dentina-polpa são complexos, os aspectos incluindo o vascularização, as interações da célula-matriz, a incorporação do fator de crescimento, a degradação da matriz, o mineralização, o controle de contaminação devem ser considerados. O projeto 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 a regeneração do complexo da dentina-polpa.

SAKAI *et al.* (2011) afirmaram que a polpa dental humana contém subpopulação pequena de células tronco multipotente, demonstrado por sua habilidade de diferenciar-se em odontoblastos, células neurais, e células do endotélio-vascular. 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 multipotentes e se aderirem neste arcabouço e poder assim se expressar e se diferenciar. A disponibilidade dos estudos experimentais projetados e especificamente o potencial de diferenciação de células tronco dentais da polpa teve um papel importante nestas descobertas.

KAJBAFZADEH *et al.* (2013) realizaram que a descélularização 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 descélularizados como um primeiro passo de engenharia de tecido do cólon. O processo de descélularização 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 extra celular descelularizadas não suportaram quaisquer danos inesperados ou mudanças estruturais que a tornaram incapaz de tolerar as forças *in vivo*. 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) afirmaram que o uso de tecido do tendão descelularizados como *scaffold* para a engenharia tecidual, ofereciam grandes oportunidades para futuras aplicações clínicas e de pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento e dois detergentes diferentes, t-octil-phenoxyethoxyethanol (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 extra-celular. 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) relataram que 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, que foram produzidos *in vitro* utilizando uma cartilagem natural, mantida a matriz extracelular MEC através da combinação de um processo de descelularização, 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) descreveram 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 descelularizado, 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* integro da válvula.

FAULK *et al.* (2013) comentaram 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) descreveram 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. Concluíram que a matriz extracelular suína pode ser um excelente *scaffold* para as aplicações de ET.

ISINO & FUJISATO (2015) afirmaram que os tecidos descclularizados, 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 tensoativos 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 menor imuno rejeição do que o enxerto tratados com SDS.

RIBEIRO *et al.* (2015) em revisão sistemática concluíram que a esterilização por óxido de etileno é o padrão ouro dentre os métodos de esterilização a baixa temperatura.

PARMAKSIZ *et al.* (2016) relataram que a descelularização é o processo de remover os componentes celulares dos tecidos ou órgãos. É uma tecnologia promissora para a obtenção de um biomaterial com uma matriz extracelular (MEC) altamente preservada, que também pode atuar como um suporte biológico para a engenharia de tecidos e terapias regenerativas. Os produtos descelularizados ganham importância clínica e espaço de mercado devido à sua facilidade de produção padronizada,

disponibilidade constante de enxertia e superioridade mecânica ou bioquímica contra opções clínicas concorrentes, produzindo resultados clínicos à frente dos autoenxertos em algumas aplicações. As desvantagens e limitações atuais dos tratamentos tradicionais e aplicações clínicas podem ser superadas usando matrizes descelularizadas ou acelulares. Várias empresas estão liderando o mercado com produtos acelulares versáteis projetados para diversos usos na reconstrução de tecidos e órgãos.

STOLZ *et al.* (2017) relataram que a relevância da pesquisa em órgãos reconstruídos é justificada pela falta de órgãos disponíveis para transplante e as necessidades crescentes devido ao envelhecimento da população. O desenvolvimento de um órgão reconstruído envolve duas etapas complementares paralelas: a descelularização do órgão com a necessidade de manter a integridade estrutural da matriz extracelular e da rede vascular e revitalização do *scaffold* com células-tronco ou células residentes. Para o fígado, coração, pulmão ou rins, é particularmente difícil devido à complexidade estrutural dos órgãos e à heterogeneidade das células. Órgãos de roedores, suínos e macacos *rhesus* foram descelularizados para obter um arcabouço com matriz extracelular e rede vascular preservada. No que concerne às células para revitalização, foram propostas células-tronco embrionárias, fetais, adultas, progenitoras e também iPS. A construção do coração poderia ser uma opção alternativa para o tratamento da insuficiência cardíaca. Baseia-se no uso de uma matriz extra-celular proveniente do coração de um animal e semeada com células capazes de reconstruir uma função cardíaca normal. Embora as técnicas de descelularização agora pareçam controladas, os problemas colocados pela seleção de células capazes de gerar os vários componentes do tecido

cardíaco ainda não estão resolvidos. Além disso, a recolonização da matriz não depende apenas do fenótipo das células que são usadas, mas também é afetada pela natureza dos sinais bioquímicos emitidos. Pesquisas recentes mostraram que é possível usar o fígado inteiro descelularizado tratado por detergentes, como *scaffold*, que mantém toda a rede de vasos sanguíneos e a matriz extracelular integrada (MEC). Além das células de semeadura de órgão de descelularizado todo órgão escolhido para repovoar um esqueleto de fígado descelularizado são críticos para a função do fígado de bioengenharia. Atualmente, as fontes celulares potenciais são hepatócitos e células-tronco mesenquimais. A regeneração pulmonar utilizando abordagens de engenharia é complexa. De fato, vários tipos de células progenitoras locais que contribuem para o reparo celular foram descritos em diferentes níveis do trato respiratório. Movendo-se em direção aos alvéolos, encontram-se células-tronco bronquioalveolares, bem como células epiteliais e pneumócitos. Uma opção promissora para aumentar o pool de órgãos doadores é usar pulmões alogênicos ou xenogênicos descelularizados como um arcabouço para projetar *ex vivo* o tecido pulmonar funcional. O rim é certamente um dos órgãos mais difíceis de reconstruir devido à sua natureza complexa e à natureza heterogênea do órgão. Há relativamente pouca pesquisa sobre construção automática, e experimentos foram realizados em ratos, porcos e macacos. No entanto, antes que essas abordagens terapêuticas possam ser aplicadas na prática clínica, muitas pesquisas são necessárias para entender e, em particular, o comportamento das células em órgãos descelularizados, bem como os mecanismos de sua interação com o microambiente. Os conhecimentos atuais permitem otimismo para o futuro, mas as respostas definitivas só podem ser dadas após estudos a longo prazo em animais e estudos clínicos

controlados.

PORZIONATO *et al.* (2018) afirmaram que a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa envolvem muitos materiais artificiais e biológicos diferentes, frequentemente integrados em *scaffolds* compósitos, que podem ser repovoados com vários tipos de células. Um dos *scaffolds* mais promissores é a matriz extracelular alogênica descelularizada (ECM), então recellularizada por células tronco ou autólogas, a fim de desenvolver abordagens clínicas totalmente personalizadas. Os protocolos de descelularização têm que remover com eficiência os materiais celulares imunogênicos, mantendo a MEC não imunogênica, que é dotada de ações específicas indutoras / diferenciadoras devido à sua arquitetura e fatores bioativos. Revisaram a literatura disponível sobre o desenvolvimento de enxertos de tecidos / órgãos humanos descelularizados. Os tecidos humanos podem ser obtidos não apenas a partir de cirurgia, mas também de cadáveres, sugerindo possível desenvolvimento de BioBancos de tecidos humanos a partir de programas de doação de corpos. Muitos tecidos / órgãos humanos foram descelularizados para fins de ET, como cartilagem, ossos, músculo esquelético, tendões, tecido adiposo, coração, vasos, pulmão, polpa dentária, intestino, fígado, pâncreas, rim, gônadas, útero, produtos de parto, córnea e nervos periféricos. Recelularizações *in vitro* foram relatadas com vários tipos de células e procedimentos (semeadura, injeção e perfusão). Por outro lado, estudos sobre o comportamento *in vivo* são mal representados. Na verdade, o desafio futuro será o desenvolvimento de enxertos humanos a serem implantados totalmente restaurados em todos os seus aspectos estruturais / funcionais.

ARAUJO *et al.* (2018) relataram que a perda de tecidos devido a

defeitos congênitos, processos patológicos ou traumas estimulou o desenvolvimento da engenharia tecidual com objetivo de reparo ou substituição de tecidos ou órgãos danificados. Devido às suas propriedades elásticas, o tecido cartilaginoso tem sido bastante utilizado em procedimentos reconstrutivos. A utilização deste tecido como biomaterial se dá principalmente pela manutenção das propriedades tridimensionais da matriz, priorizando sustentação estrutural, mecânica e biológica para as células e permitindo remodelamento adequado. O ideal é que se obtenha um biomaterial com características de biocompatibilidade, biofuncionalidade e resistência mecânica. Neste sentido, foram desenvolvidos tratamentos a fim de minimizar possíveis processos inflamatórios e rejeição da biomembrana no receptor. Objetivou-se comparar as alterações histológicas em cartilagens elásticas de orelha externa de bovinos submetidas a diferentes métodos de conservação com tratamento químico por solução alcalina. As amostras passaram por um processo de dissecação e higienização, sendo posteriormente divididas em grupo controle e grupos de tratamentos. Foram avaliados os métodos de conservação com solução supersaturada de sal, solução supersaturada de açúcar, glicerina, formalina e solução alcalina. As amostras foram mantidas em meios de conservação durante 60 dias e em solução alcalina durante 72 horas. Posteriormente passaram por preparação, análise e interpretação em lâminas histológicas. Em cada tratamento foram avaliados parâmetros microestruturais tais como a manutenção de fibras elásticas, substância fundamental amorfa e descelularização. Em comparação aos demais grupos, foi observado que o grupo do tratamento alcalino apresentou maior descelularização, remoção da substância fundamental amorfa e manutenção da estrutura tridimensional das fibras elásticas. Por isso, este grupo foi

considerado o método mais efetivo neste estudo.

O'CONNELL *et al.* (2019) avaliaram a esterilização de hidrogéis, fundamental para a tradução clínica de muitas abordagens de biofabricação, como bioimpressão 3D baseada em extrusão de bio-tintas carregadas de células. Mais para esta esterilização ser confiável e mensurada, os métodos de esterilização podem ser destrutivos e podem ter efeitos prejudiciais aos hidrogéis de origem natural que constituem grande parte da paleta de bio-tinta. A determinação de métodos eficazes de esterilização requer uma análise detalhada dos efeitos da esterilização em propriedades relevantes, tais como viscosidade, capacidade de impressão e citocompatibilidade. No entanto, não há estudos que explorem especificamente os efeitos da esterilização em bio-tintas. Foi exploramos os efeitos de várias técnicas de esterilização em quatro dos componentes bio-tinta mais utilizados: gelatina, metacrilato de gelatina, ácido hialurônico e metacrilato de ácido hialurônico. A autoclavagem foi o método de esterilização mais destrutivo, produzindo grandes reduções na viscosidade e nas propriedades mecânicas após a reticulação. A esterilização por filtração causou alguma redução nas propriedades do hidrogel devido à remoção de componentes de maior peso molecular, mas não afetou o fotocrosslinking. O óxido de etileno (EtO) foi o método de esterilização menos destrutivo em termos de propriedades reológicas para todos os materiais, não teve efeito prejudicial nos grupos de metacrilato / metacrilamida fotossensíveis, e assim foi escolhido para um exame mais detalhado. Em análises biológicas, descobriram que o tratamento com EtO erradicou com sucesso um desafio bacteriano de *E. coli*, não causou diminuição na viabilidade de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), e não teve efeito sobre sua taxa de proliferação.

Finalmente, descobriram que os hidrogéis tratados com EtO apoiavam as hMSCs encapsuladas para se diferenciarem em direção à linhagem condrogênica e para produzir uma nova matriz de cartilagem. Concluíram que a esterilização EtO minimiza a degradação de propriedades dos hidrogéis e promove a eliminação biológica.

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 1529 de 2015. (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 nº 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 e a CAPES.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados candidatos à participação neste estudo as amostras de dentes de pacientes em tratamento ortodôntico e clínico, com indicação ortodôntica e periodontal 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 deveriam ser saudáveis, não fazer uso crônico de

medicamentos e possuir os dentes em estágios de formação radicular completo, Estagio 6 de Duailibi. A concordância na participação voluntária foi manifestada com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE III).

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, as cirurgias foram realizadas pela mesma cirurgiã dentista que realizou sempre a mesma técnica cirúrgica. Amostra foi sessenta dentes pré-molares. Os dentes com indicação clínica de extração foram cirurgicamente removidos, sob anestesia local 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.

As amostras foram transportadas 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 submetidas:

1. Formol 100% das amostras (1-100);
2. GF0= Grupo controle formol (1 -10), 10 amostras controle mantidas em formol;
3. GD= Grupo experimental (51-100), 50 amostras experimental foram desmineralizados/ descelularizados com Phosphate saline buffer (PBS) e 28g de EDTA, peróxido de hidrogênio a 9% e detergente enzimático.

As amostras permaneceram no EDTA (30 dias), depois foram introduzidos em Peróxido de hidrogênio a 9% (30 dias) e detergente enzimático onde permaneceram por mais 30 dias, totalizando 12 semanas em soluções, foram lavados em água corrente, mantidos por 30 dias em água estilada depois foram secos em temperatura ambiente por 24 horas e embalados em papel grau cirúrgico para serem esterilizados.

Este papel é próprio para esterilização com uma face em papel cirúrgico e a outra em filme bi-laminado: poliéster/ polipropileno, permeável ao vapor e ao ar, impermeável à microorganismos, resistentes ao calor, livre de nutrientes microbianos e resíduos tóxicos. Permite a visibilização do material. Possui indicador químico que muda de cor após o processo de esterilização em autoclave e óxido de etileno.

A divisão dos grupos foi aleatória no grupo experimental:

- Grupo F0 (1-10) controle não foram submetidos a nenhum tratamento;
- Grupo D1 (51-60) submetidos a esterilização calor seco;
- Grupo D2 (61-70) submetidos a esterilização calor úmido;
- Grupo D3 (71-80) submetidos a esterilização óxido de etileno;
- Grupo D4 (81-90) submetidos a descellularização para controle;
- Grupo D5 (91-100) submetidos a esterilização radiação Gama.

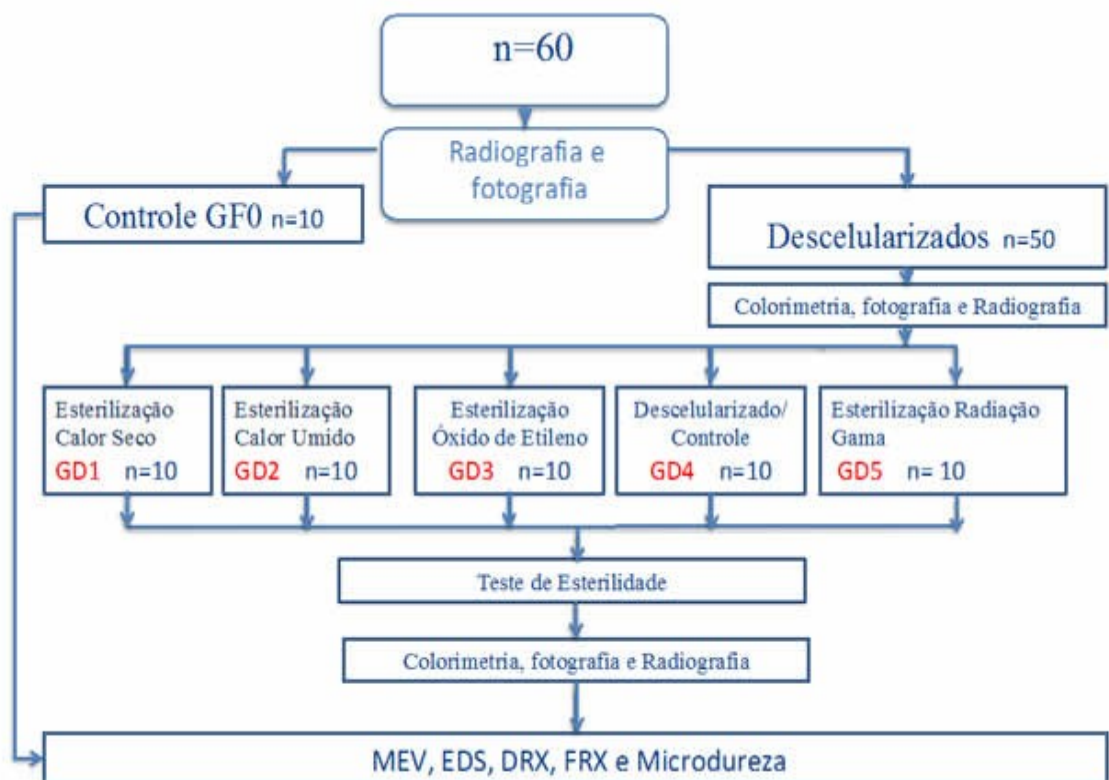


Figura 1 – Fluxograma do método

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 de marca Shimadzu, modelo AY220 Max 220g d=0,1mg tara 100%, com variação de 0,0001g, calibrada. 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.

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

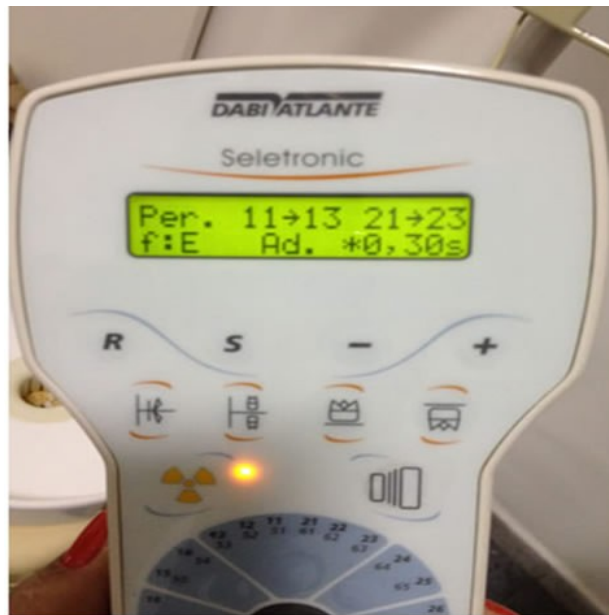


Figura 2 - Dispositivo para tomada de radiografia, tempo de exposição do rx de 30 segundos.

Foram utilizadas as amostras de dentes hígidos, com indicação clínica de extração.

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.

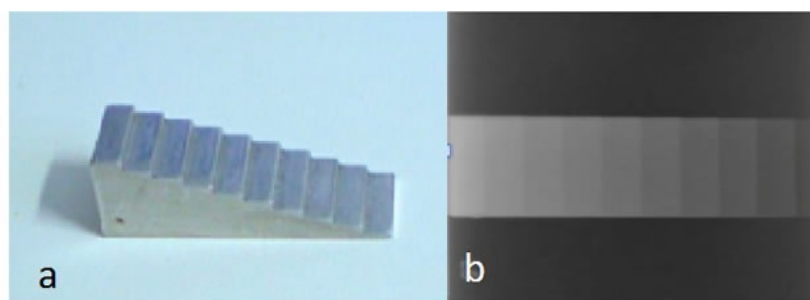


Figura 3– a- Escalímetro de alumínio para padronização de tons de cinza; b- película radiográfica e pode comparar a radiopacidade/radiolucidez das amostras.

4.8 COLORIMETRIA

O colorímetro CR-400 é um equipamento de medição portátil, projetado para avaliar a cor de objetos, especialmente com superfícies em condições mais suaves ou com variação de cor mínima. Através de fórmulas de avaliação padrão ou personalizados, este colorímetro confiável e de alta precisão, ajuda os usuários a controlar a qualidade de cor, consistência e aparência de suas amostras, em um processo simplificado mais eficiente internamente e em toda a cadeia de produção. Ele identifica com precisão as características de cor em objetos, determina as diferenças de cor entre os objetos e fornece avaliações aprovadas/reprovadas para determinar imediatamente se a amostra atende ao padrão definido. Isso faz com que o CR-400 seja ideal para inspeções de cores de alimentos, material de construção, plástico e aplicações dermatológicas no controle de qualidade e garantia de qualidade.

O colorímetro CR-400 é compatível com um processador de dados opcional para imprimir os resultados no local ou com o software SpectraMagic NX para gravar as medições e fornecer uma análise de cores mais abrangente.



Figura 4 - Colorímetro Chroma Meter CR-400- Konica Minolta Camera Co. Osaka, Japão

4.9 ESTERILIZAÇÃO

CALOR SECO: é utilizado para aqueles materiais que não podem ser esterilizados por vapor ou aqueles que suportam altas temperaturas. Possui as seguintes vantagens: não é corrosivo para metais e instrumentos de corte; não desgasta vidrarias; tem alto poder de penetração; pode-se esterilizar vidros a temperaturas mais altas, consumindo menor tempo de esterilização.

Possui as seguintes desvantagens:

- O aquecimento é lento; requer longos períodos para estabilização da temperatura;
- Tem uma tendência de estratificação, ou seja, forma camadas de ar com diferentes valores para a temperatura.

A temperatura estabelecida para o processo foi de 170 °C a 120 minutos, e foi controlada com um termômetro coadjuvante.



Figura 5 - Estufa com termômetro coadjuvante para controle da temperatura.

CALOR ÚMIDO: 126 a 129⁰C (1,7 a 1,8 Kgf/cm², por 20 minutos de esterilização e 30 minutos para secagem.

Foi realizada em uma autoclave vitale 12, Cristófoli, sendo inserida 150 ml de água destilada diretamente na câmara de esterilização, foi abastecida com as amostras a serem esterilizadas e a porta foi fechada adequadamente, selecionou-se a tecla de inicio e ocorreu a etapa de aquecimento, esterilização e secagem, até o ciclo estar encerrado e ascender o Led de Fim de ciclo.



Figura 6 – Autoclave, equipamento para esterilizar por calor úmido

ÓXIDO DE ETILENO:

O óxido de etileno (ETO) é um gás utilizado desde a segunda Guerra Mundial como alternativa de esterilização a baixa temperatura, notadamente no caso de produtos e artigos médico-hospitalares com componentes plásticos ou termossensíveis que não resistem a temperaturas superiores a 60⁰C ou a processos de radiação. Apresenta grande eficácia na destruição dos microorganismos formadores de esporos. A esterilização é normalmente executada na faixa de 40⁰C e 80⁰C e uma concentração de gás normalmente acima de 400mg/l com duração média de ciclo de três até mais de 10 horas.

Este gás penetra em papel, tecido e alguns filmes plásticos, mas pesa sobre ele o fato de ser altamente inflamável, tóxico e cancerígeno, o que exige cuidados. No Brasil, a Portaria Interministerial MS/MET nº 482, em vigor desde abril de 1999, estabelece procedimentos para as instalações de unidades de esterilização com esse tipo de gás e disciplina ainda as suas misturas e seu uso.

O processo de esterilização com ETO normalmente inclui uma fase de pré-condicionamento ou condicionamento, seguida de vácuo para a retirada do ar do interior da câmara, entrada de gás inerte e agente esterilizante (ETO), exposição, lavagens com gás inerte e ar para remover resíduos de ETO e, por fim, uma aeração completa para eliminar o gás da carga.

O ciclo de esterilização pode ser dividido em seis partes:

- a) Teste de segurança e integridade: Nesta fase o equipamento realiza uma série de testes automáticos para verificar a segurança do sistema e a hermeticidade do vaso. Caso haja qualquer falha ou vazamento, o sistema deve disparar um alarme e impedir que o ciclo continue.
- b) Vácuo/Pulsos de nitrogênio Fase em que se retira todo o oxigênio da câmara e do material a ser processado, garantindo a segurança do processo e a correta penetrabilidade do gás.
- c) Verificação/controle da umidade Fase em que a umidade relativa é verificada e eventualmente corrigida, para que o gás possa agir dentro das condições ideais de processo.
- d) Injeção do gás e manutenção do tempo de exposição. Somente nesta fase é que o gás ETO é injetado na câmara e após atingir os níveis de pressão e temperatura ajustados o tempo de exposição para a ser considerado.

e) Retirada e lavagem do gás Ao término da fase de exposição ao ETO processa-se uma fase de vácuo com sequências de injeção de nitrogênio, para a retirada completa do gás e diminuição dos riscos.

f) Aeração forçada. Após a retirada do gás ocorre uma fase onde pulsos de ar são executados a fim de retirar o residual do ETO nos produtos, garantindo assim a qualidade final do processo.

A empresa que realizou este processo foi a Acecil.

-Gás utilizado: mistura de 30% de ETO + 70% CO₂

- umidade relativa: 40 a 70%

- pressão 0,4 a 0,5 kgf/cm²

- temperatura: 45 a 55°C

- tempo de exposição: 4 horas



Figura 7 - Camara de óxido de etileno

RADIAÇÃO GAMA:

A radiação ionizante é uma das alternativas para casos que requerem esterilização “a frio”, podendo ser empregada em sólidos e fluidos. A radioesterilização consiste na redução dos micro-organismos, impedindo

que se reproduzam, pela quebra de suas cadeias moleculares (DNA) e induzindo reações dos fragmentos com o oxigênio atmosférico ou compostos oxigenados. Tecnicamente, duas fontes podem ser utilizadas no processo de radiação ionizante: raios gama de fontes seladas de Cobalto-60 ou feixe de elétrons de aceleradores industriais de média e alta energias.

Mais recentemente, vem sendo utilizada também na esterilização de tecidos humanos (ossos e peles) para enxerto e pacientes com graves queimaduras.

A dose da radiação utilizada foi de 25 kGy com Irradiador Multipropósito de ^{60}Co .

Esta esterilização foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações- CTR/IPEN/CNEN-SP.



Figura 8 – Irradiador Multipropósito de ^{60}Co

4.10 TESTE DE ESTERILIDADE

O teste de esterilidade foi aplicado as amostras esterilizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira, devendo ser estéreis, adequados para revelar a presença de bactérias e fungos. Sendo realizado por amostragem, a extensão do resultado ao restante do lote requer a segurança de que todas

as unidades do mesmo lote tenham sido preparadas de modo a garantir sua esterilidade, de acordo com as boas práticas de fabricação.

O teste de esterilidade foi realizado sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar classe II tipo A, instalada em sala limpa. Essas condições foram adequadas para evitar contaminação acidental das amostras.

Os meios de cultura utilizados para testes de esterilidade foram meio fluido de (THIO) tioglicolato e o TSB, realizado em duplicata.

O primeiro foi utilizado primariamente para cultura de bactérias anaeróbicas, embora também, possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas. O segundo é adequado para a cultura de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas.

Foram preparados 22 tubos com os caldos para o processo de esterilidade, 11 de THIO e 11 de TSB.

O controle negativo um tubo de cada caldo sem amostra.

O controle positivo da amostra submetida ao processamento de desmineralização e descelularização sem esterilização, sendo uma amostra em cada caldo.

Segundo controle positivo amostras submetida ao processamento de desmineralização e descelularização sem esterilização inoculada microorganismo. Tem por finalidade garantir que o resíduo do processamento não seja suficiente para inibir o crescimento microbiano.

Controle com os caldos inoculados com microorganismos sem amostras.

Para cada processo de esterilização foram utilizadas 4 amostras, sendo :

GD1 57, 58, 59 e 60;

GD2 62, 63, 61 e 69;

GD3 74, 75, 79 e 78;

GD4 81, 82, 83 e 87;

GD5 92, 97, 98 e 100;

Todos os tubos permaneceram em incubadora a $37,5\text{C}^0$ por 14 dias.

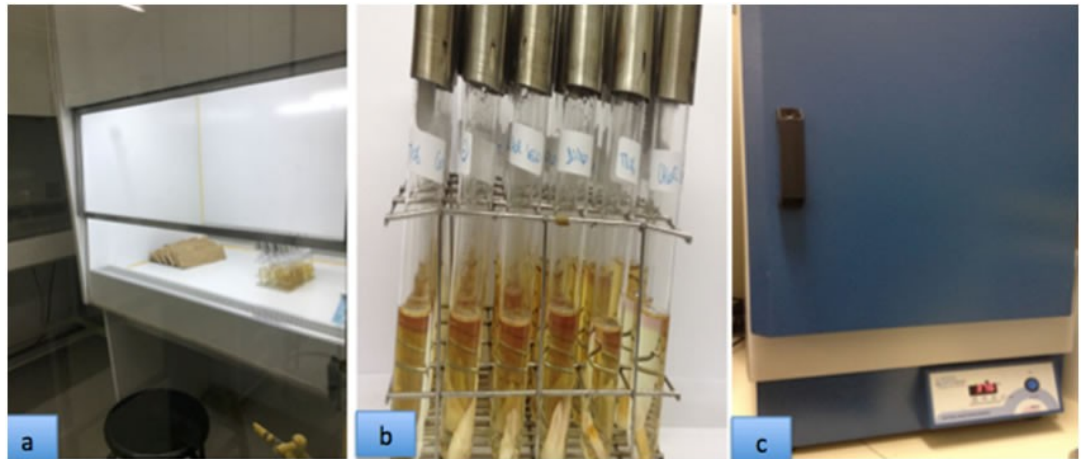


Figura 9 - a- Capela de fluxo laminar classe II tipo A; b- tubos do ensaio com as amostras; c- Incubadora .

4.11 PREPARO E SECAGEM DAS AMOSTRAS PARA ANALISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O preparo da 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 coloidal, 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. E a pressão de cobertura do ouro coloidal foi a uma pressão 10^{-6} bar.



Figura 10 - Dentes seccionados longitudinalmente após receberem ouro coloidal, antes de serem observados em MEV.



Figura 11 - Metalizador de amostras.

Foram realizadas secagem lenta, pois na secagem rápida as amostras seriam introduzidas, já nos *stubs* em estufa por uma hora, e com temperatura de 60° C. Já na secagem lenta foram submetidas a álcool 70 %, e

antes de serem fixados aos *stubs*, e permaneceram por 24 horas desidratando lentamente, em caixa hermeticamente fechada com sílica gel.

As amostras foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura após o tratamento e esterilização para a avaliação das estruturas dentárias como a localização de canalículos dentinários, canal radicular, observar o esmalte, a dentina, cemento e a polpa dental. O equipamento utilizado foi LEO (London Eletron Optical) alocado na ESALQ-USP em Piracicaba. Trata-se de uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultrafina, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. A interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem, como uma tela fluorescente em uma camada de filme fotográfico, ou detectada por um sensor como uma câmera CCD (CHALLA et al., 2005).

4.12- EDS em Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O princípio de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons para explorar a superfície de uma amostra e transmitir o sinal do detector a uma tela de vídeo, cuja varredura está sincronizada com a do feixe incidente. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) ou hexaboreto de lantânio aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons, que são coletados por detectores e convertidos em um sinal de vídeo. Quando os elétrons penetram na matéria, eles deixam de seguir a direção original do feixe e passam a se difundir aleatoriamente pelo material. Os efeitos primários dessa interação são espalhamento elástico (mudança de direção sem perda apreciável de energia) e

espalhamento inelástico (perda de energia com pequena mudança de direção). Os elétrons ao penetrarem no material constituem um volume de interação, e podem gerar elétrons secundários que são resultantes das colisões inelásticas, são de baixa energia (< 50 eV) e são originados pela excitação de elétrons fracamente ligados ao átomo do material de estudo formando imagens da ordem de 3-5 nm e consegue-se uma boa visualização da topografia da amostra. Os elétrons retroespalhados são aqueles que sofreram espalhamento elástico e possuem alta energia (da ordem de 50 eV). O sinal de BSE é resultante das interações ocorridas mais para o interior da amostra e provenientes de uma região do volume de interação, com diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário. Quanto maior o número atômico do material maior a emissão de elétrons retroespalhados, o que permite contrastar diferentes regiões de diferentes composições.

Na Espectrometria de dispersão de energia (“Energy Dispersive X-ray Spectroscopy” - EDS) o feixe de elétrons emitido pelo canhão é suficientemente energético e consegue ionizar camadas profundas dos átomos da amostra, que emitem raios X. Um detector capta os raios X e gera uma corrente elétrica proporcional à energia do fóton incidente no detector que é pré-amplificada e processada, em um sistema eletrônico. Dessa forma, constrói-se um histograma de abscissa com energia dos fótons (keV) e na ordenada o número de fótons recebidos (contagens). A interpretação do espectro, formado a partir do histograma, é facilitada por uma base de dados que contém para cada elemento da tabela periódica os valores esperados de energia. O cruzamento dessas duas informações permite identificar e quantificar os elementos que compõem a amostra. Obtenção dos resultados de MEV são as micrografias eletrônicas,

juntamente com os resultados de EDS deste trabalho, foram obtidas nos equipamentos Evo Ma 15 Zeiss do Laboratório de MEV do Departamento de Engenharia de Materiais de multiusuário de Diadema UNIFESP.

As amostras analisadas neste método estavam embutidas em baquelite, e uma fita fina de carbono estabeleceu o contato elétrico entre a superfície da amostra e o porta amostra.

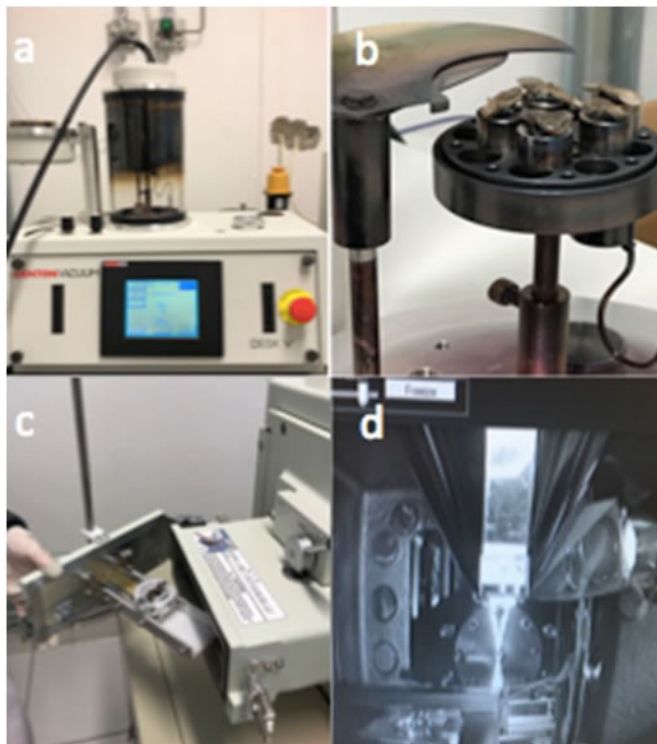


Figura 12 - EDS e MEV, Evo Ma 15 Zeiss: a- metalizador de amostra com fita de carbono; b- porta amostra metalizada; c- Camara de entrada de MEV; d- Imagem do interior do MEV com amostras em posição.

4.13 FRX

Trata-se de uma análise não destrutiva que segundo os princípios físicos da fluorescência X são simples e bem conhecidos: é possível induzir transições eletrônicas entre os orbitais mais internos dos átomos utilizando radiações eletromagnéticas de energia adequada (raios X e raios gama).

Essas transições podem resultar na emissão de radiações X de energia característica que permitem a identificação da espécie atômica envolvida na transição e a mensuração da sua abundância. Mais especificamente, neste processo a energia da radiação de fluorescência identifica o elemento, enquanto sua intensidade permite que seja medida sua concentração na amostra analisada mediante uma prévia calibragem. Destaca-se que a baixa penetração dos raios X de fluorescência na matéria, da ordem dezenas de microns, em função do elemento fluorescente e da matriz, limita a informação analítica aos estratos mais superficiais do material estudado, o que constitui uma das limitações desta técnica. (Ferreti, 2008)



Figura 13 - Aparelho da Bruker, o FRX S2 Ranger é utilizado para identificar composição de amostras sólidas e preparo de porta amostras para FRX: a- FRX S2 Ranger; b- Porta amostras.

4.14 DRX

Após o processo de esterilização, as amostras foram cortadas, e os pedaços foram triturados manualmente em almofariz cerâmico. As medidas de difração por pó foram realizadas no Laboratório Multiusuário da UNIFESP, Campus Diadema, no difratômetro D8 Advance da Bruker, com detector linear de posição do tipo LynxEye, também da Bruker. As medidas foram efetuadas com a radiação de Cu ka de comprimento de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, com varredura 2θ de 20° a 120° , passo angular de $0,02^\circ$ e tempo de exposição de 1,2 s. O pó foi colocado cuidadosamente em um porta amostra de material amorfo, polimetilmetacrilato (PPMMA), com uma cavidade circular central. Com uma fina lâmina de vidro, o pó foi levemente comprimido com o objetivo de deixá-lo no mesmo nível da cavidade central. Levado ao difratômetro, os padrões de difração foram obtidos à temperatura ambiente. A análise quantitativa e identificação das fases (AQF) foi realizada utilizando o método de Rietveld [89] com o programa TOPAS 4.2 da Bruker AXS. Os padrões CIF (crystallographic information file) foram obtidos do Inorganic Crystal Structure Database – ICSD.

Foi tomado o cuidado para que o fator de deslocamento atômico, no TOPAS denominado de Beq , quando carregado a partir dos padrões “CIFs” nunca partisse do valor inicial 0 (\AA)^2 . Ele foi refinado quando proporcionava uma melhora no refinamento, mas não somente isso, quando os resultados globais do refinamento não se tornavam irreais. Foi colocada uma restrição de $0,001 \text{ (\AA)}^2$ para o mínimo do Beq .

Para o GOF, espera-se que ao final do refinamento seu valor seja igual a 1, ou o mais próximo disso.

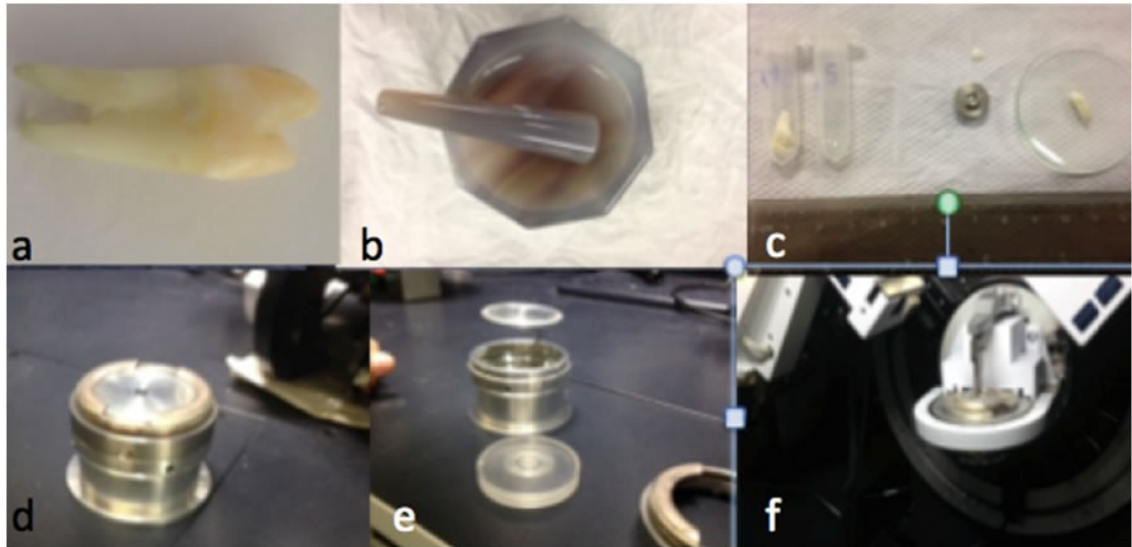


Figura 14 – Difratorômetro de Raios X: a- Amostra; b- preparo da amostra em almofariz cerâmico; c- grânulos finos; d- porta amostra; e- ajuste do porta amostra; f- inserção no DRX da amostra, Bruker AXS.

4.15- MICRODUROMETRO

O termo ‘teste da microdureza’ usualmente se refere a indentações estáticas provocadas por cargas menores que 1kgf. O indentador pode ser a pirâmide de diamante Vickers. O procedimento de teste é muito semelhante ao do teste padrão Vickers, exceto que é feito numa escala microscópica, com instrumentos de precisão mais alta.

A superfície a ser testada geralmente requer um acabamento metalográfico. Quanto menor a carga de teste, maior o grau de acabamento superficial necessário.

Microscópios são usados para medir as indentações; eles normalmente tem aumentos de 500x e medem com precisão de +0.5 microns (mm). Diferenças de até +0,2 microns podem ser observadas se o operador tiver cuidado e experiência.

O valor da dureza com a Pirâmide de Diamante de Vickers é a carga aplicada (em kgf) dividida pela área da superfície da indentação (em mm²).

Onde:

F= é a carga em kgf

d = é a media aritmética das duas diagonais , d1 e d2 em mm

HV = é a dureza Vickers

O indentador Pirâmide de Diamante Vickers tem a forma de uma pirâmide quadrada com 1360 entre faces. Para calcular o valor da dureza de Pirâmide de diamante Vickers, ambas as diagonais da indentação são medidas, e a média destes valores é usada na fórmula acima para a determinação do valor HV.

Os valores usados no estudo foram 490,3 mN, carga 0,05 e tempo de pressão de 10 segundos.



Figura 15 - Microdurometro HMV 2T Shimadzu.

4.16 HISTOLOGIA

A amostra do órgão dentário foi incluída em bloco de resina, no departamento de anatomia da USP, para análise microscópica.

O preparo iniciou-se com o processo de desidratação, mergulhando as amostras em álcool 70 por 24 horas e posteriormente em álcool a 100%, realizando a troca após 24, 48 e 56 horas, facilitando a penetração da resina. O passo seguinte foi a diafanização, que consistiu em mergulhar-se as peças em xilol por 48 horas (trocando a solução após as primeiras 24 horas), para remoção das impurezas. A inclusão foi realizada com a imersão das amostras em frasco de vidro com tampa, de aproximadamente 20ml, que serviu de molde para a resina. As peças permaneceram de 5 a 6 dias mantidas em geladeira, em solução de 25% de dibutilftalato e 75% de metilmetacrilato. Para ativação da resina utilizou-se 1% de peróxido de benzoila, por 4 a 6 dias. Após sua polimerização, foram levadas à estufa a 37° C por 48 horas e o vidro quebrado para obtenção de um bloco, e com o auxílio de serra, foi fatiado dois elementos de cada grupo, sendo respectivamente lixado e identificado, estando pronto para a preparar as lâminas, este cortes foram afinados e polidos, para remoção dos riscos produzidos pela serra, por meio de lixas abrasivas de carbeto de silício não ferroso, nas granulações de 320, 600, 2400 e 4000, depois foram coladas com cianocrilato em lâminas de acrílico incolor e transparente, com dois mm de espessura. Estas lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, Masson de Goldner e Steven Blue. As lâminas foram fotografadas sob microscopia óptica invertida AXIOVERT 40C (Carl Zeiss®) por meio de Software AxioVision® 4.1 Germany.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizadas 60 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 semanalmente o 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, descelularização e esterilização.

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

2- Análise estatística de variância de Kruskal-Wallis (SIEGEL & CASTELLAN 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 & CASTELLAN, 2006), com a finalidade de comparar os cinco grupos em relação às alterações.

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 60 dentes pertencendo a cada grupo o número de 10 dentes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

	TIO	TSB
CONTROLE NEGATIVO	-	-
CONTROLE POSITIVO	+	+
	TIO	TSB
CONTROLE POSITIVO INOCULADO	+	+
CONTROLE NEGATIVO INOCULADO	+	+
	TIO	TSB
CONTROLE POSITIVO	+	+
CALOR SECO ESTUFA	-	-
CALOR ÚMIDO AUTOCLAVE	-	-
ÓXIDO DE ETILENO	-	-
RADIAÇÃO GAMA	-	-

Figura 16 - Registro do resultado do teste de esterilidade (*)

Estes dados representam o resultado do teste de esterilidade, sendo positivo o crescimento de microorganismos e negativo ausência do crescimento microbiano, após o processo de esterilização, mostrou que somente o processo de desmineralização e descelularização não foram suficientes para eliminar os microorganismos das amostras, enquanto que todos os processos de esterilização foram eficientes no controle do crescimento microbiano.

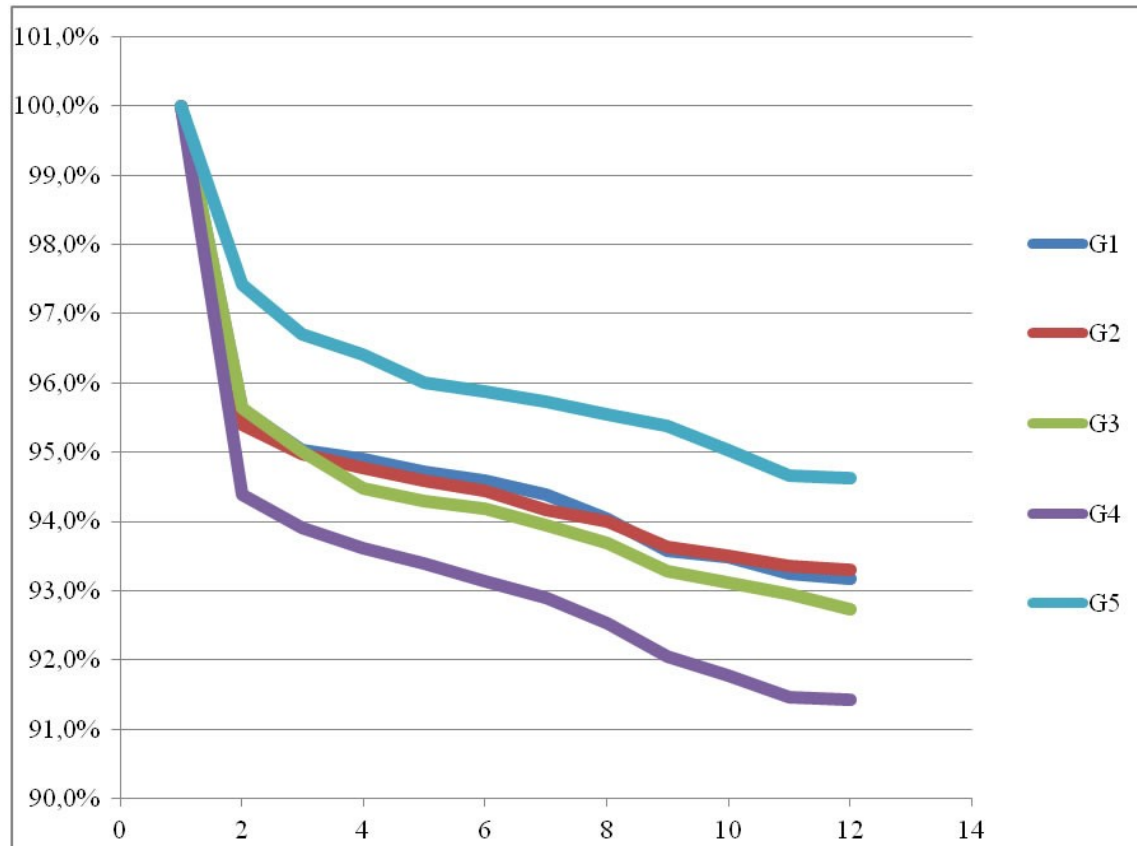


Figura 17 - Gráfico Percentual quanto a perda de massa (*).

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.

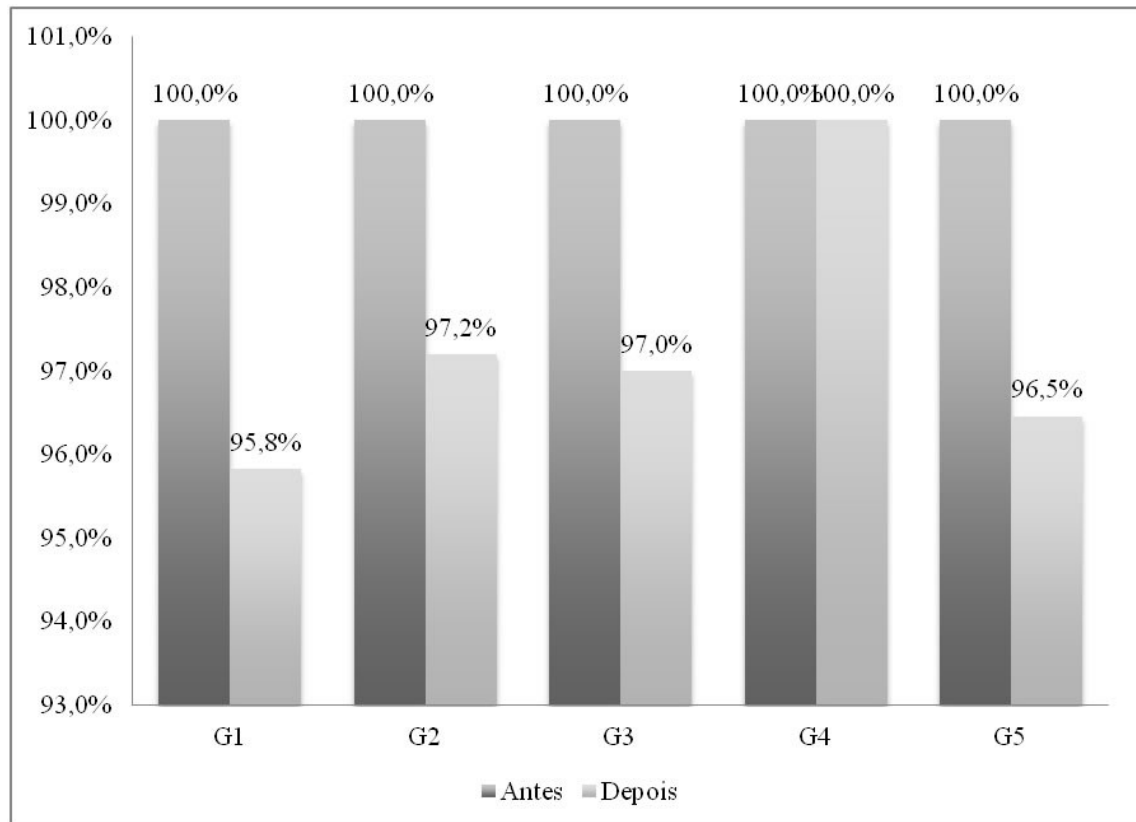


Figura 18 - Gráfico da perda de massa antes e após o processo de esterilização

Esta tabela representa a perda de massa medida em gramas nos grupos de dentes submetidos ao processo de esterilização antes e depois do tratamento de esterilização.

Teste estatístico de Kruskal- Wallis

Hipótese

H0= score obtidos da massa não variam com o tratamento de esterilização;

H1= score obtidos da massa variam com o tratamento de esterilização;

Nível de decisão: $\alpha=0,05$;

O valor de H é altamente significante 5,5385 ($p=0,0186$).

Rejeita-se a hipótese de nulidade e aceita-se a hipótese alternativa.

Verifica-se que a diferença entre os escores médios de antes e depois do tratamento de esterilização apresentam valor de p inferior ao nível alfa de 0,05; sendo considerado significativos.

Conclui-se que o tratamento de esterilização causou perda de massa.

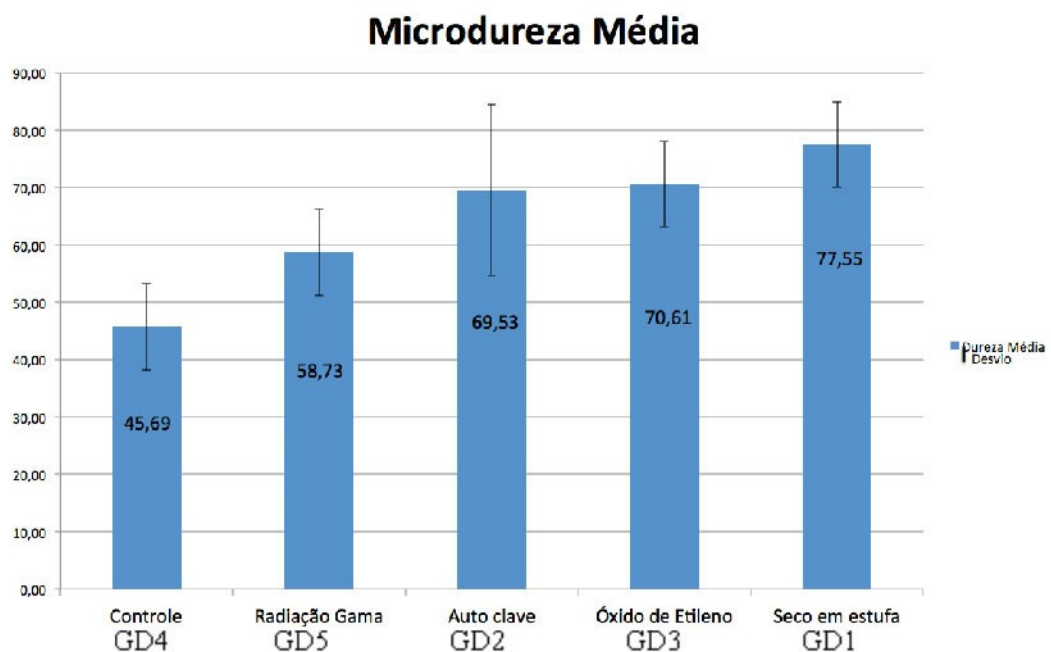


Figura 19 - Gráfico da microdureza após o processo de esterilização

Este gráfico representa a microdureza medida nos grupos de dentes submetidos ao processo de esterilização.

Com o intuito de verificar se a variação da microdureza foi aleatória, foi realizada a análise através do teste estatístico de Kruskal-Wallis

Hipótese:

H0= o tratamento de esterilização não causa variação na microdureza;

H1= o tratamento de esterilização causa variação na microdureza;

O valor de H é 52,5432 sendo altamente significativo ($p=0,00001$).
Rejeita-se a hipótese de nulidade; Aceita-se a hipótese alternativa.
Verifica-se o tratamento de esterilidade provoca alteração na dureza, sendo o GD1 (grupo calor seco) o que apresentou maior variação.

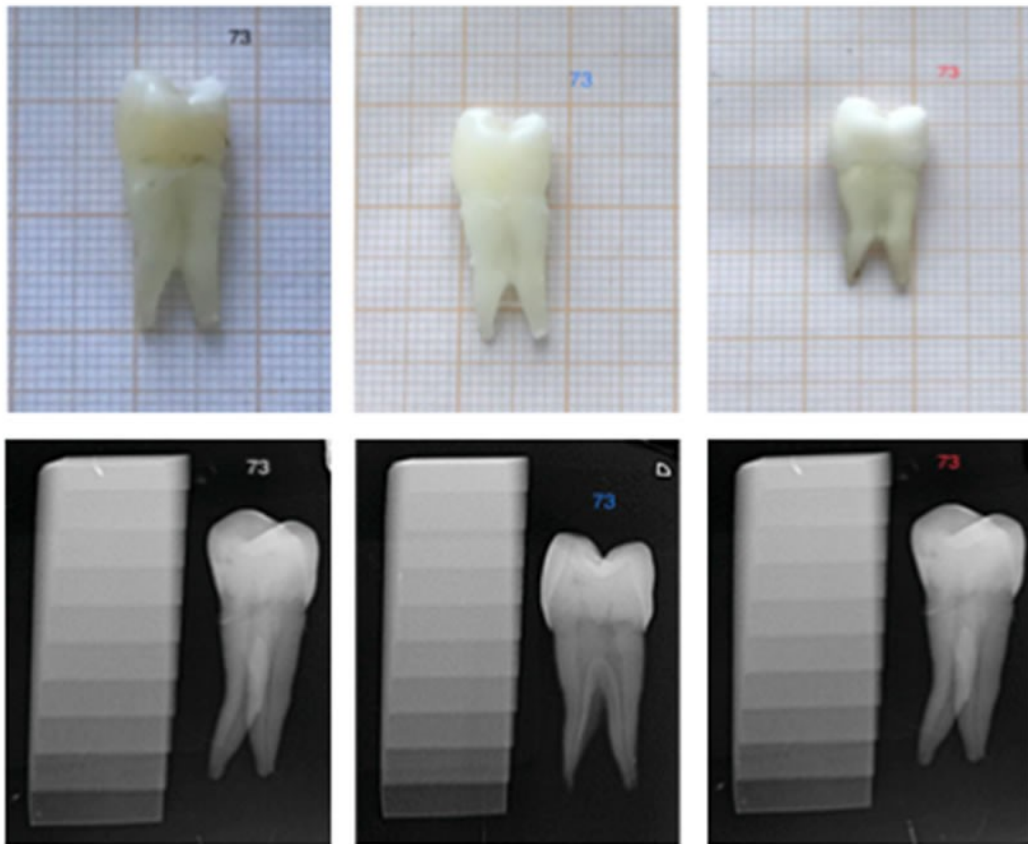


Figura 20 - Fotografia e Radiografia das amostras de dentes pré molares antes de ser submetido ao tratamento número marcado com coloração preto na fotografia, e branco na radiografia. A imagem identificada com coloração azul ocorreu após o processo de desmineralização e descelularização, e as imagens marcadas com coloração vermelha foram realizadas após o processo de esterilização.

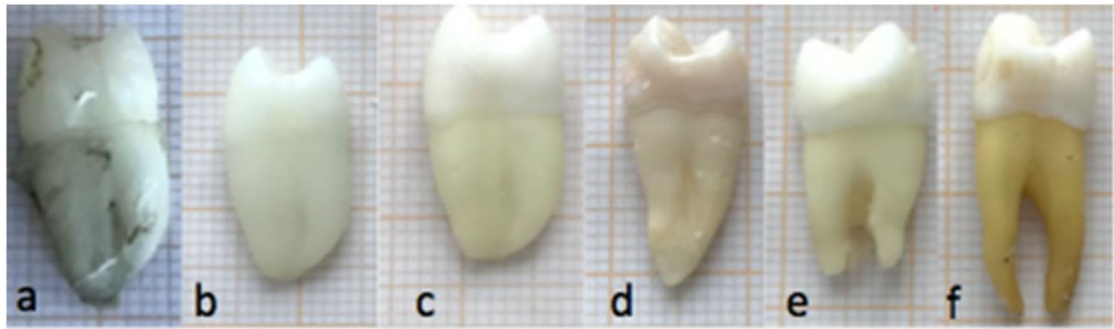


Figura 21 - Fotografia das amostras de dentes pré molares após o processo de desmineralização, descolorização e respectiva esterilização: a- Amostra em formol controle; b- Amostra descolorizada controle; c-Amostra descolorizada e esterilizada submetida à Calor Seco; d-Amostra descolorizada e esterilizada submetida à Radiação Gama; e-Amostra descolorizada e esterilizada submetida à ETO; f- Amostra descolorizada e esterilizada submetida à Calor Úmido.

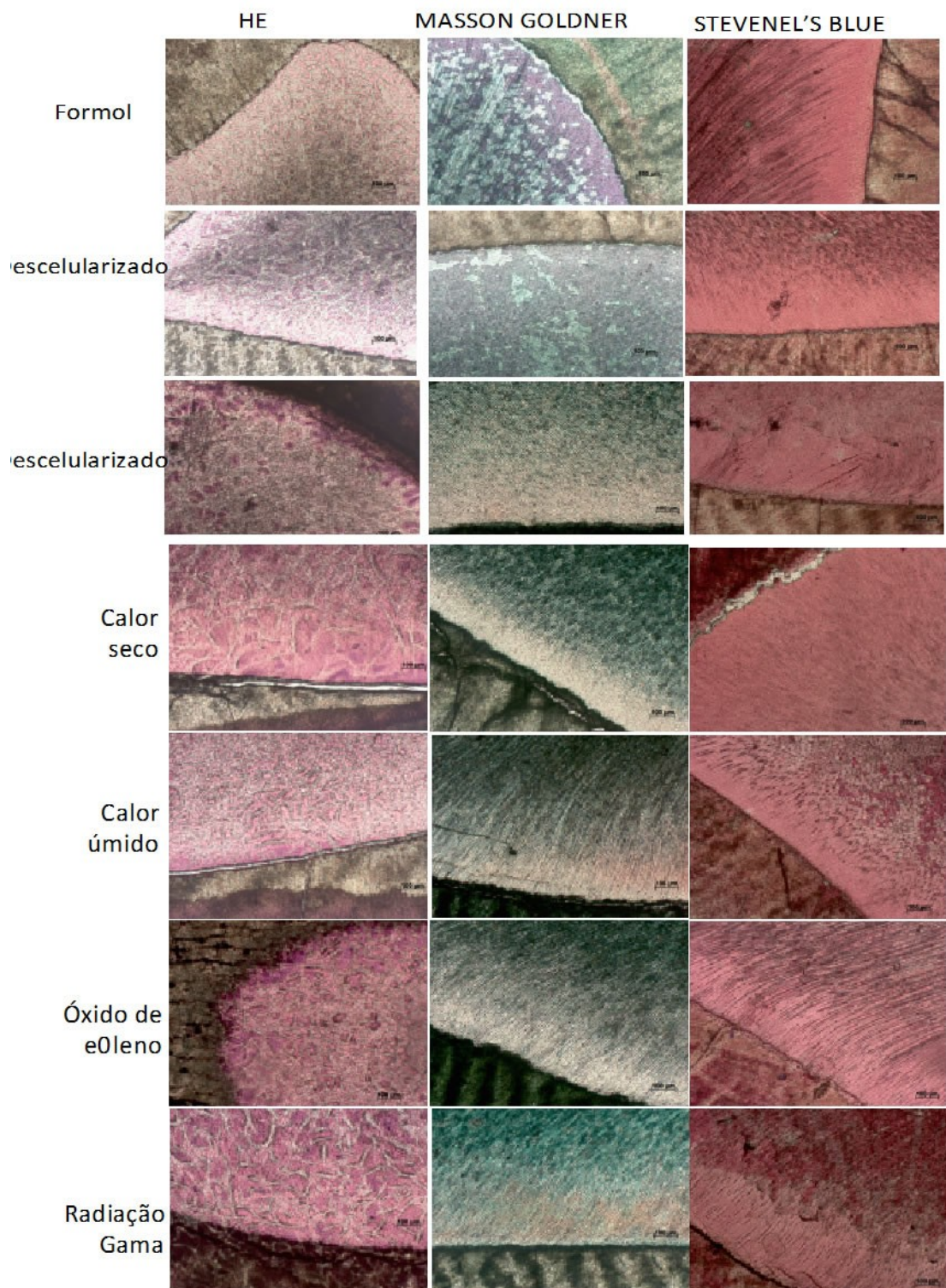


Figura 22 – Histologia das amostras de dentes pré-molares após esterilização.

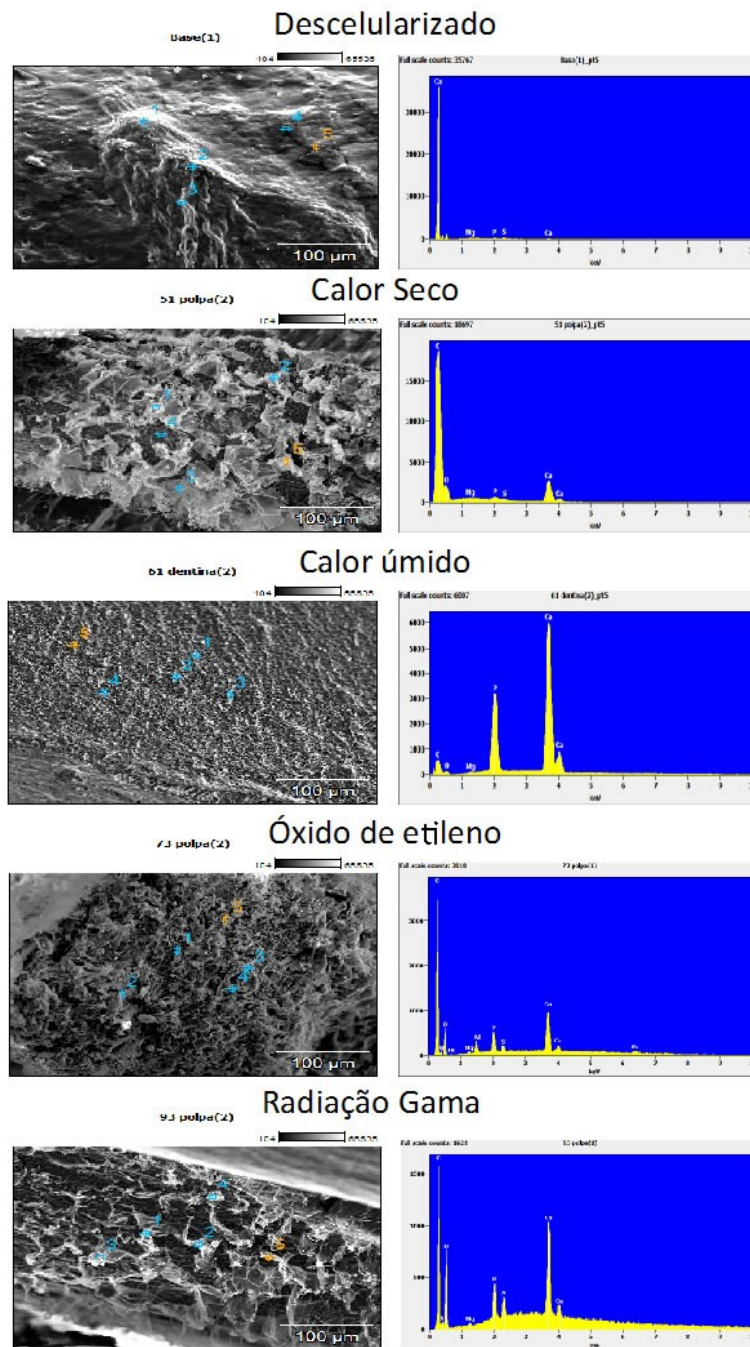


Figura 23 - Imagem de EDS após o processo de descelularização, desmineralização e esterilização.

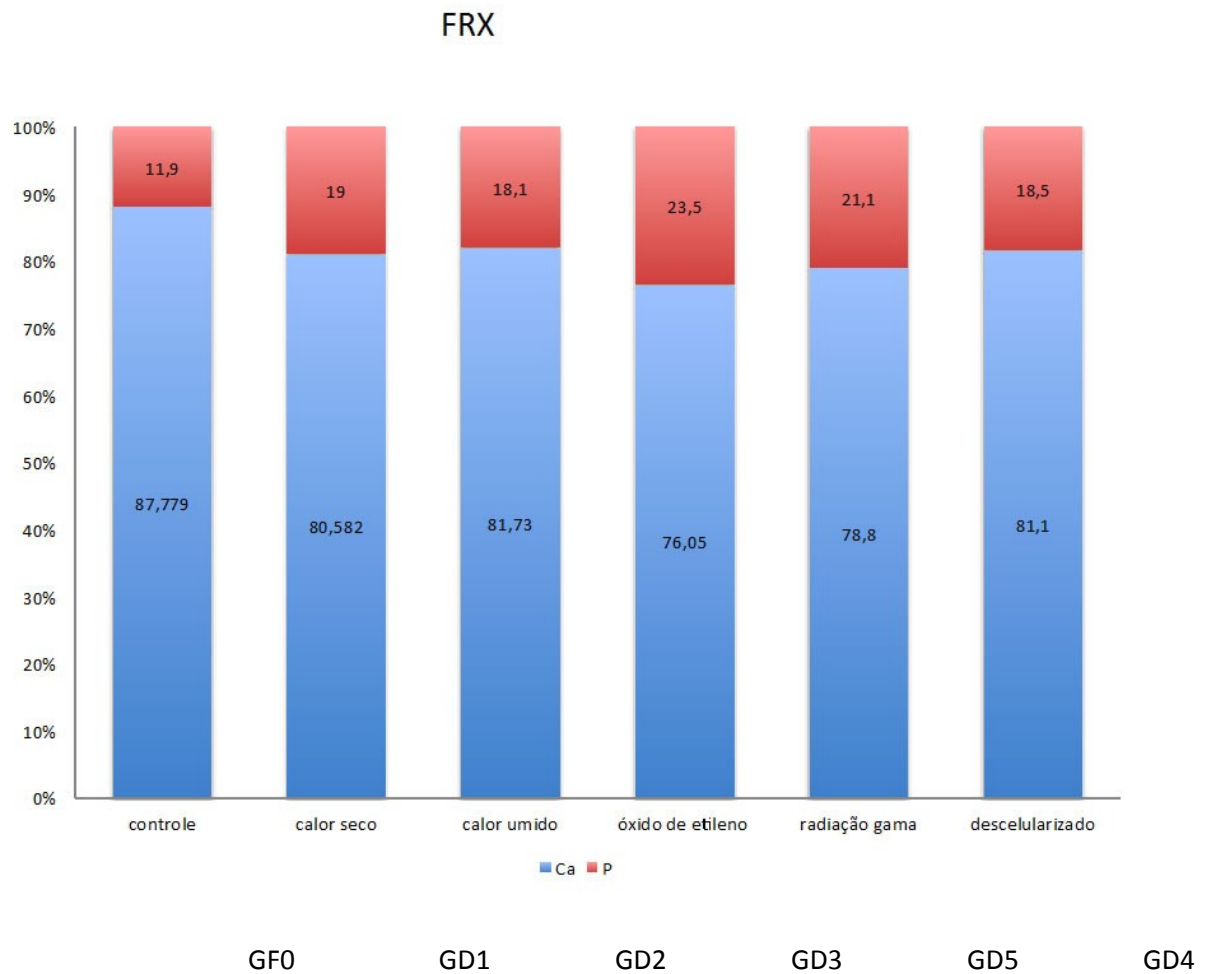


Figura 24 - FRX após o processo de descelularização, desmineralização e esterilização, avaliando a quantidade de cálcio e fósforo. Como ocorreu perda de massa o intuito foi descobrir que substância foi eliminada durante o processo. E o grupo que perdeu maior quantidade de Ca foi o grupo com esterilização de óxido de etileno.

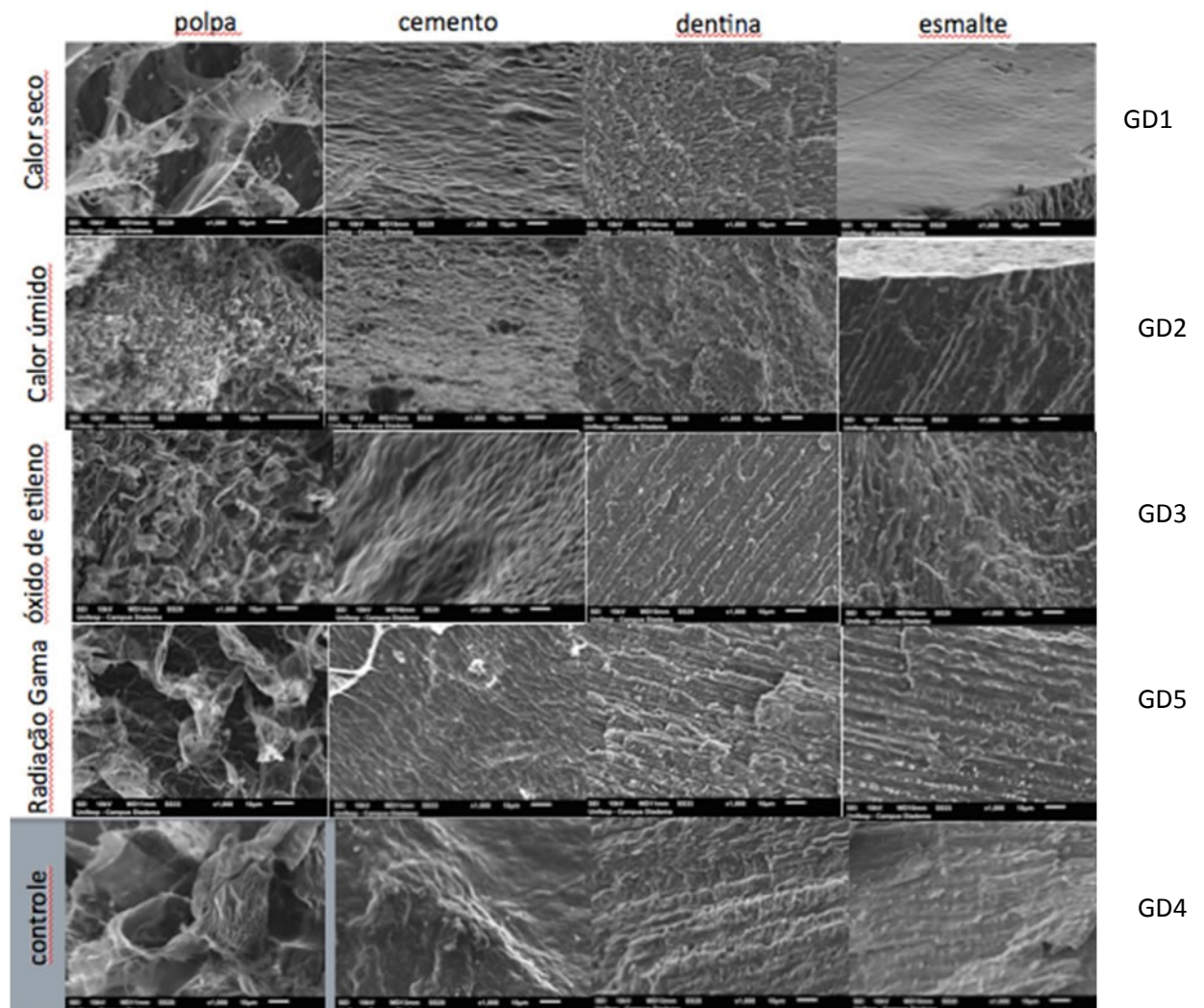


Figura 25 - MEV comparativa após o processo de esterilização, não se evidêcia alterações nas imagens de microscopia eletrônica de varredura nos diferentes grupos.

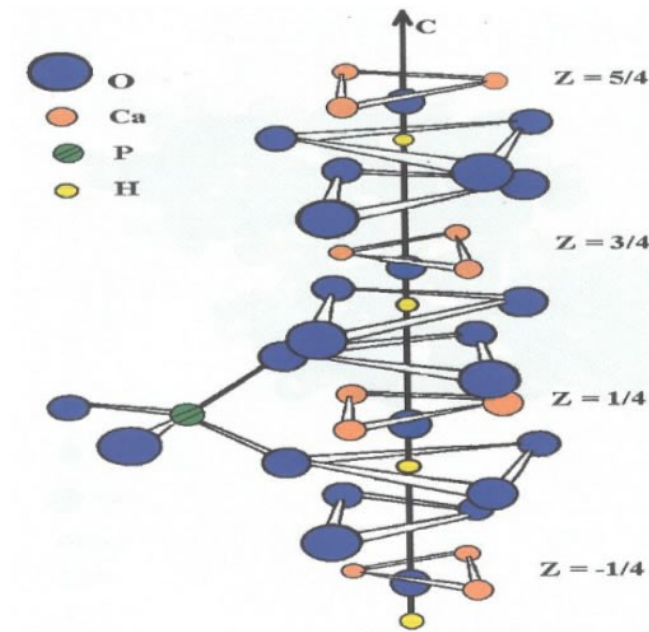


Figura 26 - Representa a disposição dos átomos na estrutura cristalina da célula unitária da hidroxiapatita, Mavropoulos (1999) cita como fonte Kay et all (1964).

https://portaldesicict.fiocruz.br/transf.php?id=00006603&lng=pt&script=thes_c_hap

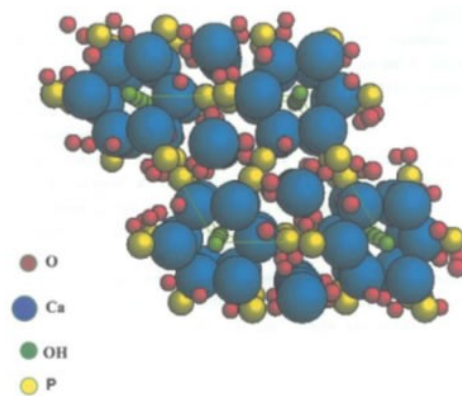


Figura 27 – estrutura da célula unitária da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

A análise da amostra submetida ao tratamento de descelularização, Figura.28, após o refinamento pelo método Rietveld (com auxílio do software Topas), nos indica que a composição é basicamente de Hidroxiapatita (98.56%), com parâmetros de refinamento Rwp 8.51 e GOF 1.40.

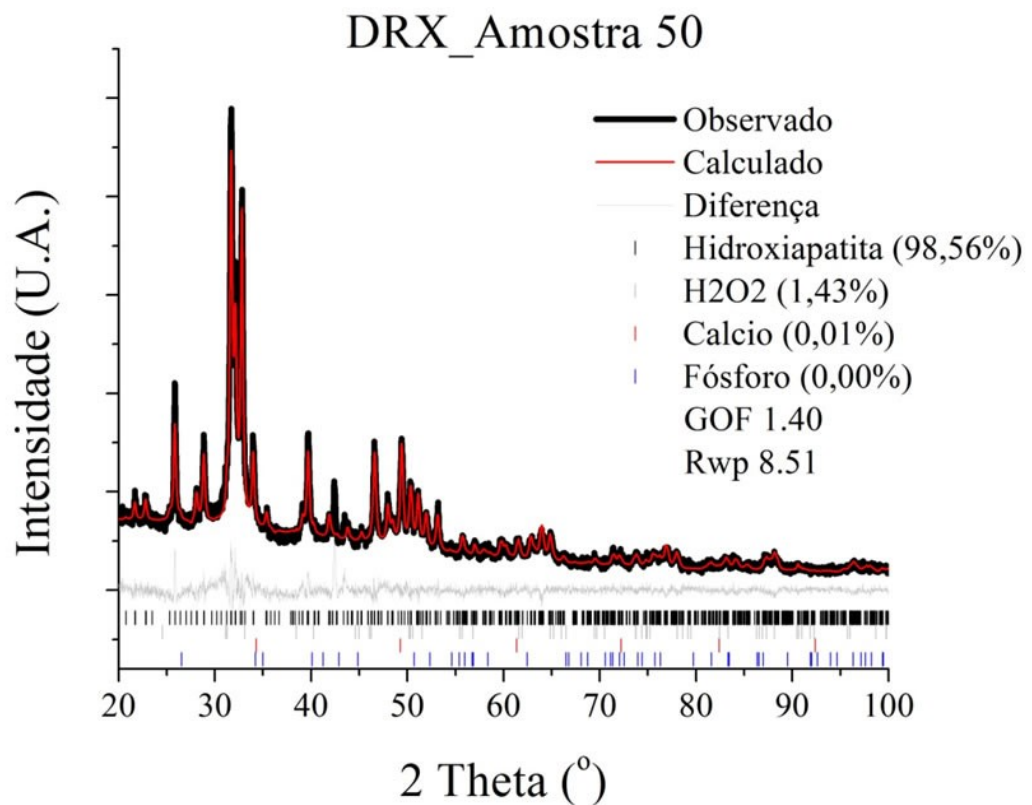


Figura 28 - Padrões de difração de raios X da amostra 50 submetida ao tratamento de descelularização, uma comparação dos ângulos equivalentes dos principais picos cristalográficos provenientes do arquivo CIF (*Crystallographic International File*), utilizados no refinamento pelo método Rietveld da amostra 50 descelularizada, através do software Topas.

A comparação das curvas, com seus principais picos de incidência sob os ângulos 2θ de $25,77^\circ$, $28,78^\circ$, $31,64^\circ$, $33,41^\circ$, $34,00^\circ$, $40,59^\circ$, $47,06^\circ$, $49,27^\circ$ e $53,28^\circ$ mostra que a estrutura cristalina não sofreu alterações significativas.

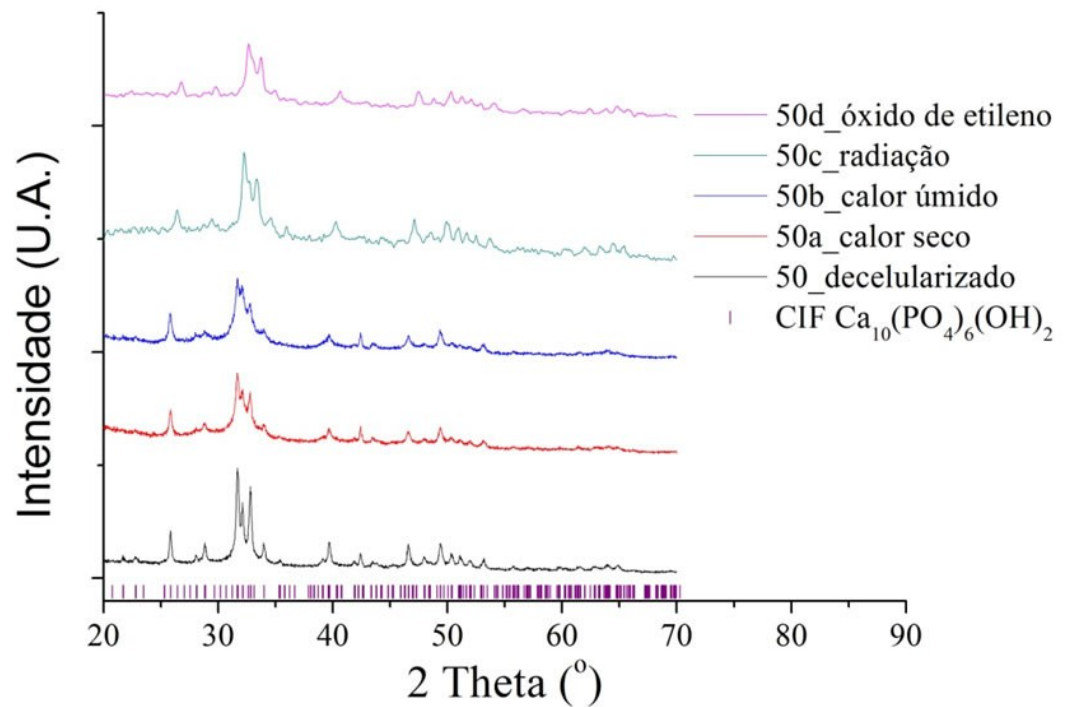


Figura 29 – Comparativo dos difratogramas de raios X do grupo dos discos da amostra 50 - apenas decelularizado; 50a - submetida ao processo de esterilização em calor seco; 50b – submetida ao calor úmido; 50c – submetida à radiação gama; e 50d – submetida ao óxido de etileno; além dos ângulos correspondentes da posição dos átomos e seus respectivos planos cristalográficos.

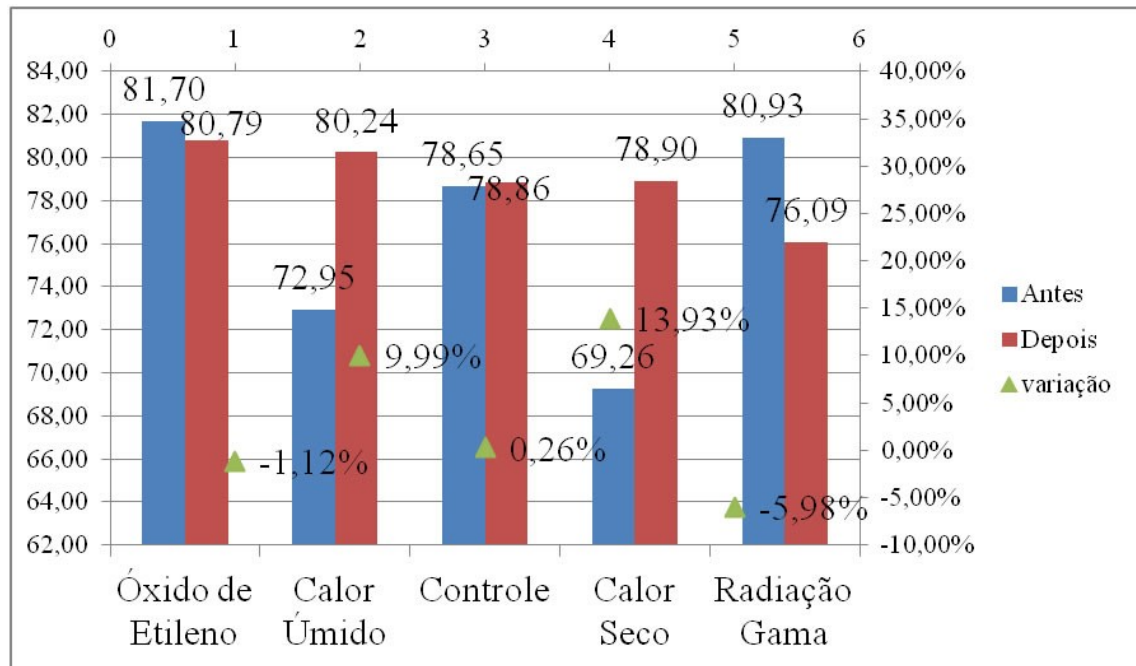


Figura 30 – Colorimetria – medições quantitativas antes e depois dos tratamentos de esterilização e respectiva variação.

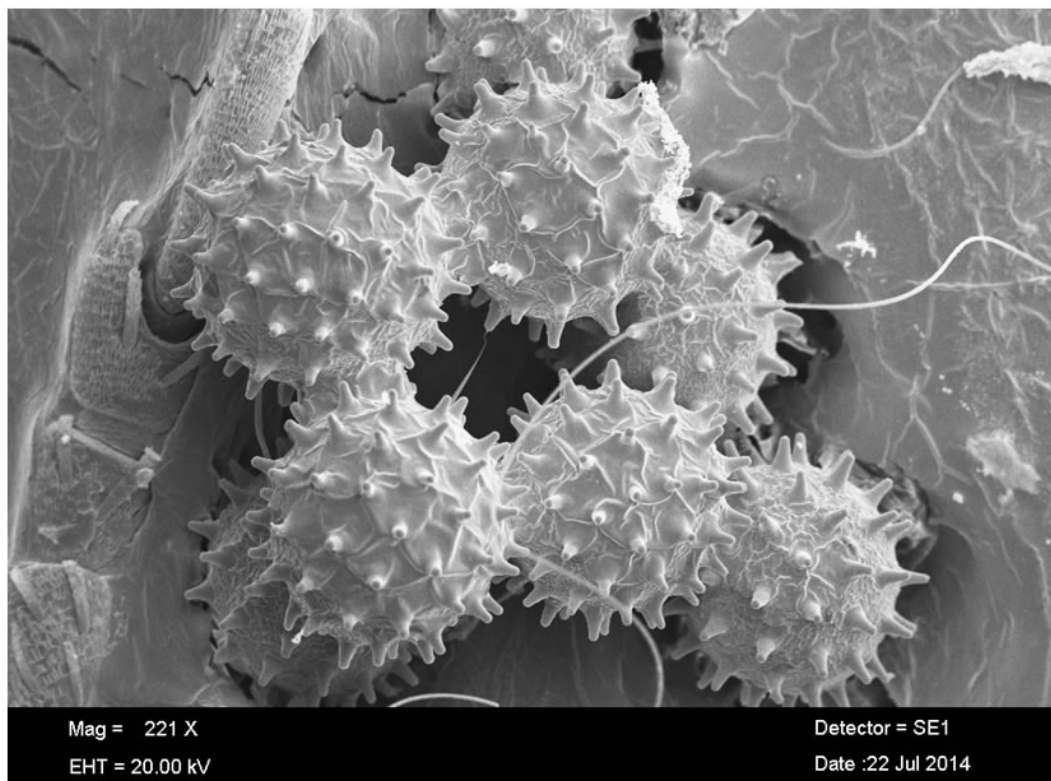


Figura 31 - Imagem de contaminação obtida através de microscopia eletrônica de varredura.

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 avanços tecnológicos inimagináveis. (Duailibi *et al.* 2011)

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 conseqüentemente 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 da MEC.

Scaffolds (ASTM) são substratos à base de biomateriais para utilização em Regeneração Tecidual, com capacidade 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 comportado células vivas em atividade, o propósito de mimetizar este *Scaffold* é estudar qual a porosidade, consistência, copiar ao máximo sua macro e microgeometria.

Prosecká *et al* 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* 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.*, 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. Nesse estudo foi observado que as substâncias de descelularização e desmineralização interferem na limpeza dos poros, tornando-os mais acessíveis, devido 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 *scaffolds* incorporem características e imitem a MEC, ajudando a criar um ambiente capaz de facilitar a adesão, a proliferação, a diferenciação das células e promover o campo da regeneração tecidual.

“O desenho do dente constitui uma maravilha da Engenharia visto que é capaz de absorver energias estáticas e dinâmicas” (ANUSAVICE, 1998). Os tecidos dentários estão sujeitos a forças de compressão de aproximadamente 700N (CALLISTER JR, 2002; JONES, 2001). Com o teste de microdureza foi constatado que o grupo GD1 (calor seco) apresentou a maior microdureza, seguido do GD3 (óxido de etileno), GD2 (calor úmido), GD5 (radiação gama), comparando ao GD4(grupo experimental controle), nos dá indícios que todos processos promoveram aumento de microdureza superficial.

No esmalte é considerado o tecido mais mineralizado do corpo humano, o esmalte é composto basicamente por HAP cristalina em estrutura Ca (PO) (OH) e uma baixa proporção de água e matéria orgânica (proteína e lipídeos).

As análises comparativas entre as amostras dos difratogramas obtidos no equipamento de DRX, e seu posterior refinamento pelo método Rietveld através do software Topas, usando arquivos cristalográficos (CIF) apontaram que não houve alteração significativa na estrutura cristalina das amostras.

A dentina é um composto biológico constituído de uma matriz de colágeno preenchida com cristalitos de apatita de tamanhos nanométricos.

Estes cristalitos são de Ca, ricos em carbonato, ions de F e Mg e apresentam-se dispersos entre cilindros ocos quase paralelos chamados canalículos ou túbulos dentinários (JONES, 2001). Esses elementos foram identificados nas leituras de Spectrometria de Dispersão de Energia (EDS), os dados medidos não permitem apontar uma diferença significativa entre os métodos. Os canalículos foram visualizados nas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), neste equipamento também foram identificados resíduos biológicos em 30% das amostras.

A dentina é menos friável e menos dura que o esmalte e, como está localizada subjacente a este último, promove um suporte diante das tensões criadas no sistema. Em testes de compressão, a dentina possui módulo de elasticidade entre 14GPa e 19GPa e resistência de 230 a 370MPa. Sua resistência à tração é de 50MPa e dureza de 50VHN a 60VHN (REYES-GASGA, 2002).

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

Na literatura, autores utilizam o EDTA com o propósito de desmineralizar, como Neves *et al* (2011), que afirmam em seus resultados que não há nenhum problema nos tecidos que requerem a descalcificação, e que o EDTA é a melhor escolha para o desmineralização nos casos que não são urgentes. Zacaro *et al* (2010) dizem 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 *et al* (2008) afirma em seu trabalho que o EDTA chega a extrair 86,72% de cálcio, além de Emans *et al* (2005) concluírem que a descalcificação com EDTA de 10% é também o método mais seguro de descalcificação. Diante dessas considerações, a escolha pelo

desmineralizante foi o EDTA de 28g diluído em PBS com pH 4 (no intuito de aumentar a velocidade da desmineralização). Foram realizados testes pilotos para que tivéssemos segurança e controle na desmineralização sem o risco da destruição da MEC.

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 essa remoção de restos celulares e tecidos dos dentes a serem descelularizados.

Em estudos realizados pelo grupo, a dosagem de 25KGy apresentou menor impacto na coloração de amostras de dentes, por isso foi decidido manter essa dosagem de radiação gama também nesse projeto.

O método de desmineralização/descelularização empregado foi o que obteve melhor performance no estudo de Iwamoto *et al* (2015) com EDTA, peróxido de hidrogênio e detergente enzimático.

Outro estudo prévio foi realizado para observar diferenças entre o grupo controle formol 10% e o dente recém-extraído sem fixação. Foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde não houveram evidências de diferenças significativas entre as características (esmalte, dentina, cemento e polpa) do dente mantido em formol e o recém-extraído.

Existe uma grande diferença entre o grupo formol 0 (GF0) e o grupo experimental descelularizado (GD), onde, no primeiro há a preservação das células, qualquer estudo apontaria para diferenças muito significativas e com grandes amplitudes comparativas. Como o intuito do projeto é comparar os métodos de esterilização, se fez necessário produzir um segundo grupo controle, GD4, para aproximar o grupo de referência aos

demais e poderemos comparar apenas os resultados dos processos de esterilização.

As amostras foram fotografadas e radiografadas no início e fim da descelularização e também da esterilização, sempre mantidas em frascos de vidro durante todo o processo, logo após as amostras foram secas e embaladas em papel grau cirúrgico próprio para os métodos de esterilização escolhidos.

Foram analisados 60 dentes pré-molares, sendo 10 dentes em cada grupo distribuídos de forma aleatória. O grupo formol 0 (GF0) e o grupo descelularizado 4 (GD4) nos serviram de controle. Foi identificada uma grande diferença na análise histológica entre esses dois grupos, o GD4 apresentou significativa redução das células, enquanto que o GF0 manteve-se com as características originais, viabilizando uma comparação mais realista entre todos os grupos descelularizados, onde foi analisada a semelhança histológica sob os critérios de alteração de dentina, polpa, cemento e coloração nos quatro processos de esterilização. Não foram detectadas variações significativas, mesmo com as lâminas tendo sido tratadas com três colorações distintas (Hematoxilina-Eosina, Masson Goldener e Stevenel's Blue). As amostras do grupo formol apresentaram as mesmas características tanto macro quanto microscópicas.

Após o tratamento de esterilização não foi detectada, em nenhum grupo, a presença de células vivas, somente alterações nas propriedades estruturais e menor concentração de cálcio, constatado nas medições do equipamento de Fluorescência de Raio-X (Figura. 24), com consequente redução de peso, e alteração na coloração e microdureza.

As amostras submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio associado ao detergente enzimático, descrito por Iwamoto *et al* 2015, apresentaram alterações de componentes estruturais do dente. A eficácia da

limpeza foi constatada através da ausência de sombras na imagem do MEV e na histologia. Também neste estudo, 30% das amostras apresentaram resíduos pulpare, coincidindo com os resultados do estudo acima referenciado.

O processo de desmineralização ocorreu com sucesso, com consequente perda de coloração, diminuição de massa e alterações na MEC durante o período de utilização do EDTA. Já o processo de descelularização, conforme descrito, não garante a total eliminação de resíduos biológicos para transformar este *scaffold* em um produto médico de Engenharia Tecidual (TEMP's), haveria a necessidade de estar em condições assépticas para ser implantado no receptor. O teste de esterilidade mostrou indícios que somente os procedimentos de desmineralização e descelularização não foram suficientes para eliminar os microorganismos das amostras (Figura 31), já todos os processos de esterilização aplicados neste estudo eliminaram o crescimento microbiano no teste de esterilidade. A esterilização se faz necessária para uma futura instalação no receptor ou para este *scaffold* ser repopulado com células.

No aspecto fotográfico, observamos a alteração de coloração das amostras (Figura 21), todas as amostras que receberam o tratamento com peróxido de hidrogênio apresentaram alteração de coloração, compatível com as medidas quantitativas do aparelho de colorimetria (Figura 30), mas mantendo suas características macroscópicas.

No aspecto radiográfico, foram analisados os critérios de radiopacidade, de forma e tamanho. Com exceção do GF0, todos os grupos que foram submetidos ao EDTA sofreram desmineralização e perderam cálcio, substância detectada com a análise de FRX (figura 24) e consequente alteraram na radiopacidade. Nos critérios de forma e tamanho

anátomo radiográfico (Figura 20) não apresentaram diferenças nos grupos após o processo de esterilização.

Nas análises no equipamento FRX, a maior perda de cálcio foi observada no grupo de esterilização com óxido de etileno (GD3), como pode ser observado na Figura 24.

Após o refinamento pelo método Rietveld dos difratogramas obtidos no equipamento de DRX (Figura 28 e Figura 29), notou-se que a estrutura cristalina da hidroxiapatita permaneceu inalterada em todos os grupos, mantendo sua característica original.

Nas medidas realizadas no equipamento EDS, foram identificados os mesmos elementos químicos em todos os grupos (Figura 23), com predominância de Ca e P.

A análise de microdureza (Figura 19) apontou para o grupo de calor seco (GD1), valores mais elevados, sucedida por óxido de etileno (GD3), calor úmido (GD2) e a menor microdureza foi encontrada no grupo de radiação gama (GD5), com valores próximos ao grupo controle (GD4).

A Engenharia Tecidual visa eliminar o doador de órgão, Langer & Vacanti (1993), sendo necessário biomimetizá-los, para se obter conhecimentos que ajudem a ter referências amplas. A falta de padrão para o desenvolvimento do neo-tecido nos obriga a ter condutas e estratégias plausíveis 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 essa é a melhor prótese acessível atualmente. Mas em estudos recentes foram relatadas a presença de partículas deste material em tecidos adjacentes, com complicações carcinogênicas. DEL AMO *et al.* (2018)

Assim, a busca de um substituto ideal natural impulsiona novos estudos em biologia molecular, Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa, proporcionando alternativas a profissionais que vislumbram novos horizontes terapêuticos e que almejam soluções biológicas para solucionar antigos problemas.

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

PERSPECTIVAS

Utilizar estas amostras como *scaffold* natural ou seja *bioscaffold* e semear cultura celular, avaliar sua toxicidade e sua performance quando comparada a *scaffolds* com biomateriais.

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.

Desenvolver um método para remover a polpa dentária com a mínima alteração da morfologia do dente.

Analisar a adesão celular, e topografia de superfície.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Somente o processo de desmineralização e descelularização não foram suficientes para eliminar os microorganismos das amostras, enquanto que todos os processos de esterilização foram eficientes no controle do crescimento microbiano. Nas análises estruturais ocorreram modificação quanto a microdureza e coloração após esterilização.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- 1- Anusavice K. Management of dental caries as a chronic infectious disease J Dent Educ.1998;62:791-802.
- 2- Azevedo, J.C.; Cruz, A.S.; Pinto, T.J.A. Avaliação da biocompatibilidade de implantes mamários de silicone esterilizados por calor seco e pelo óxido de etileno. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- 3- Banguera, 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.
- 4- Baptista, Pedro Miguel Almeida de Matos. Liver regeneration and tissue engineering. Tese de Doutorado da Universidade de Lisboa, 2008.
- 5- 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.
- 6- 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.
- 7- 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>
- 8- 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
- 9- Bragg, W.H. “The Structure of the Diamond: Abstract: Nature”. *Nature.* 1913.
- 10- Bortolin, E.; De Angelis, C.; Quattrini, M.C.; Barlascini, O.; Fattibene, P. Detection of ionizing radiation treatment in glass used for healthcare products. *Radiat Prot Dosimetry.* 2019 Feb 26. pii: ncz014. doi: 10.1093/rpd/ncz014
- 11- 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
- 12- Callister Jr, W. D. 2002. *Ciência e Engenharia de Materiais Uma Introdução* Rio de Janeiro Livros Técnicos e Científicos 2008.
- 13- Carvalho. K.C.N. *A Esterilização.* Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Dourados. 2002
- 14- Cheary, R.; Coelho, A.; Cline, J.. A fundamental parameters approach to X-ray line-profile.pdf. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology.* 2004.
- 15- 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.
- 16- 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.

-
- 17- 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.
- 18- Del Amo, F.S.L., Fretwurst, T., Garaicoa, C.A., Castilho, R.M. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. *Clinical oral Implants Research*. October 2018, 1-17.
- 19- Donlan, RM; Wu, P.; Grainger, DW; Ratner, B.D. *An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press: San Diego, 2^a Ed. 2004
- 20- 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.
- 21- 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.
- 22- 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.
- 23- 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.
- 24- 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.

-
- 25- Ferreti M, Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais. Revista CPC, São Paulo, n.7, pp 74-98, nov 2008/abr 2009
- 26- Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. Adv Dent Res. 2011 Jul;23(3):333-9.
- 27- Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F. Decellularization of tissue and organs. Biomaterials. 2006. (27): 3675-83.
- 28- 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.
- 29- 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).
- 30- Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. J Neurosurg 1988; 68: 117-23.
- 31- Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications. J Dent Res. 2011 Aug 9.
- 32- Higaskino, CEK; Figel, IC; Yamada MPA. Dossiê técnico Controle de esterilização em produtos odonto medico hospitalar. Instituto de tecnologia do Paraná. 2007.
- 33- Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. Tissue Eng. 2004; 10: 1346-58
- 34- 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.

-
- 35- Iwamoto, LAS; Duailibi, MT; Iwamoto,GY; Juliano, Y; Duailibi, MS; Duailibi, SE. Tooth tissue engineering: tooth decelularization for natural scaffold. *Future Sci OA*. 2016 Mar 31;2(2):FSO121. doi: 10.4155/fsoa-2016-0016. eCollection 2016 Jun.
- 36- Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports*, Volume 42, Issues 3–5, May 2001, Pages 75-205.
- 37- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia básica: texto/atlas*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 185.
- 38- 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
- 39- 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.
- 40- 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.
- 41- Langer,R.;Vacanti,JP. Tissue engineering. *Science*. May 14;260(5110):920-6.
- 42- 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.

-
- 43- Lu, H., Hoshiba, T., Kawazoe, N., Chen, G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2011 (32): 2489-99.
- 44- 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.
- 45- 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.
- 46- 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.
- 47- 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.
- 48- Nolla CM. The development of the permanent teeth. *J. Dent. Child*. 1960;27:254-66.
- 49- O'Connell, C.D; Onofrillo, C.; Duchi, S.; Li, X.; Zhang, Y.; Tian, P.; Lu, L.; Trengove, L.; Quigley, A.; Gambhir, S.; Khansari, A.; Mladenovska, T.; O'Connor, A.J.; Di Bella, C.; Choong, P.F.; Wallace, G.G. Evaluation of sterilisation methods for bio-ink components: gelatin, gelatin methacryloyl, hyaluronic acid and hyaluronic acid methacryloyl. *Biofabrication*. 2019 Feb 28. doi: 10.1088/1758-5090/ab0b7c.
- 50- 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.
- 51- Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elgin, Y.M. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2016 Mar 17;11(2):022003. doi: 10.1088/1748-6041/11/2/022003
- 52- 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.
- 53- 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.
- 54- Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 18;19(12). pii: E4117. doi: 10.3390/ijms19124117.
- 55- Prosecká E, Rampichová M, Vojtová L, Tvrđík 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
- 56- Reyes-Gasga R. Analysis of the electron-beam radiation damage of TEM samples in the acceleration energy range from 0.1 to 2 MeV using the standard theory for fast electrons *Radiation Physics and Chemistry.* Volume 64, Issues 5–6, August 2002, Pages 359-367

-
- 57- Ribeiro MM, Neumann VA , Padoveze MC, Graziano KU. Eficácia e efetividade do álcool na desinfecção de materiais semi-críticos: revisão sistemática. *Rev Latino-Am Enferm.* 2015;23(4):741-52. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1169.0266.2611>
- 58- 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.
- 59- Rutala, WA. APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994,1995,1996 Association for Professionals in infection control and Epidemiology. *Am J Infect Control* 1996 Aug;24(4): 313-42
- 60- 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.
- 61- Siegel, S. E Castellan JR, N.J. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Segunda edição- Artmed- Porto Alegre- 448p 2006
- 62- Song, J.J. & Ott, H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine.* 2011. XX: 1-9.
- 63- Stoltz JF, Zhang L, Ye JS, De Isla N. Organ reconstruction: Dream or reality for the future. *Biomed Mater Eng.* 2017;28(s1):S121-S127. doi: 10.3233/BME-171633.
- 64- Thomas W. Gilbert,b, Tiffany L. Sellaroa,b, Stephen F. Badylaka,c, Decelularização of tissues and organs *Biomaterials* 27 (2006) 3675–3683
- 65- 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.
- 66- 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.
- 67- 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.
- 68- 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
- 69- 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.
- 70- 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
- 71- 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.
- 72- Laue, Max Von. 1915. “Concerning the detection of X-ray interferences”. *Nobel lecture*.

-
- 73- Mavropoulos, Elena. 1999. “A Hidroxiapatita como Removedora de Chumbo”. *Fundação Oswaldo Cruz: Escola Nacional de Saúde Pública de Toxicologia*.
- 74- Scardi, P., L. B. McCusker, R. B. Von Dreele, D. E. Cox, e D. Louër. 1999. “Rietveld refinement guidelines”. *Journal of Applied Crystallography*.

NORMAS ADOTADAS

ISO- International Standardization Organization

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

ABNT 6023- Associação Brasileira de normas técnicas

ASTM F 2150-02 American Society Test Materials F07/123

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. 25^a 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.

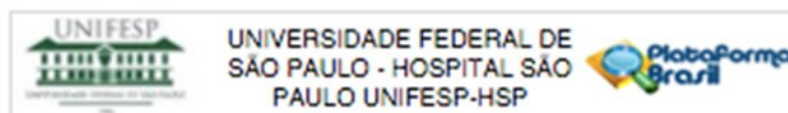
PubMed.gov. U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

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

APÊNDICE 1

APÊNDICE 1.

FOLHA DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO 1529 de 07/01/2016



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO PARA SCAFFOLD NATURAL USADO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Pesquisador: Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51823815.4.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.384.822

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta de pendências apontadas no parecer 1.373.364 de 17/12/2015

Nº CEP: 1529/2015

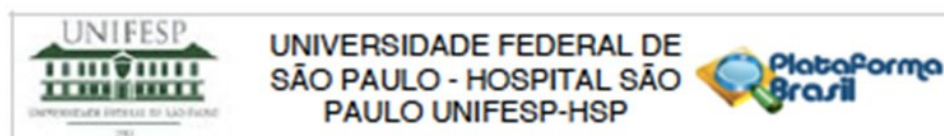
A Engenharia Tecidual é definida como uma ciência multidisciplinar que visa a construção de órgãos ou partes substitutas. Scaffolds são conhecidos como arcabouços naturais ou sintéticos que permitem guiar o crescimento celular, para que se tomem estruturalmente unidos transformando os em produtos médicos denominados

Temp7s, e para que estes produtos possam ser implantados em serem vivos, eles devem estar esterilizados, diminuindo o risco de infecção e viabilizar o próprio scaffold na interação com os tecidos receptores do organismo e sucessivamente aplicados em medicina regenerativa.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese: Eliminar toda forma de vida presente neste scaffold para que sua utilização seja possível em Engenharia Tecidual
Objetivo Primário: Desmineralizar, descelularizar e esterilizar os scaffolds

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



Continuação do Parecer: 1.264.622

naturais

Objetivo Secundário: Desmineralizar, descolularizar e esterilizar os scaffolds naturais, para transforma-los em produtos denominados Temp'is usados em Engenharia Tecidual

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito no parecer 1.373.364 de 17/12/2015

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme descrito no parecer 1.373.364 de 17/12/2015

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme descrito no parecer 1.373.364 de 17/12/2015

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias apontadas no parecer 1.373.364 de 17/12/2015

1. Serão utilizados dentes extraídos de pacientes com idade entre 14-45 anos, que seriam descartados após a extração. Havendo participação de menores de idade no estudo, além do TCLE (assinado pelo responsável legal), deverá apresentar também Termo de Assentimento que deverá ser aplicado ao participante menor de idade.

2. No projeto, item aspectos éticos, informa que projeto será submetido a Comissão de ética e pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, obedecendo a resolução 196/96. Favor corrigir, informando que o projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp, obedecendo a resolução CNS 466/12 (resolução 196/96 foi revogada)

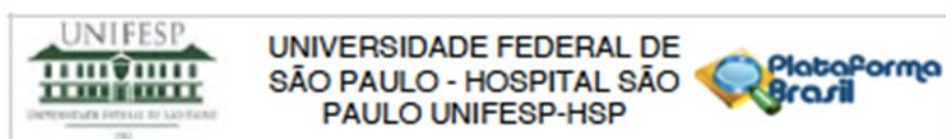
resosta: as adequações foram realizadas conforme solicitado - pendencias atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Corq. 14
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.564.622

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_508649.pdf	18/12/2015 09:44:38		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartacep2015.docx	18/12/2015 09:43:31	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOASSENTIMENTO2015.docx	18/12/2015 09:12:52	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2015doutorado.docx	18/12/2015 09:08:32	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOdoutorado.docx	04/12/2015 12:43:04	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	09/11/2015 16:21:49	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	09/11/2015 16:04:14	Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

APÊNDICE 2

APÊNDICE 2.

Tabela 1 - Medidas semanais da perda de massa durante o período de estudo.

51	1,516	1,439	1,433	1,432	1,432	1,43	1,42	1,412	1,41	1,408	1,406	1,404
52	1,475	1,42	1,414	1,414	1,413	1,411	1,41	1,399	1,393	1,392	1,39	1,39
53	1,225	1,17	1,162	1,16	1,158	1,156	1,153	1,15	1,144	1,143	1,142	1,141
54	1,266	1,202	1,195	1,194	1,192	1,19	1,188	1,182	1,174	1,174	1,173	1,171
55	1,809	1,749	1,742	1,74	1,739	1,738	1,734	1,716	1,711	1,711	1,711	1,71
56	1,164	1,109	1,102	1,1	1,094	1,092	1,09	1,087	1,083	1,081	1,08	1,08
57	1,354	1,318	1,311	1,311	1,31	1,31	1,31	1,31	1,303	1,3	1,289	1,288
58	1,437	1,378	1,364	1,36	1,357	1,355	1,353	1,352	1,341	1,34	1,328	1,327
59	1,04	0,977	0,968	0,965	0,963	0,962	0,962	0,962	0,956	0,954	0,952	0,951
60	1,13	1,078	1,072	1,07	1,065	1,063	1,06	1,058	1,053	1,052	1,051	1,05
61	1,356	1,314	1,308	1,305	1,303	1,3	1,29	1,287	1,283	1,283	1,282	1,281
62	1,434	1,387	1,382	1,381	1,379	1,376	1,373	1,371	1,366	1,365	1,364	1,363
63	1,6	1,535	1,528	1,52	1,518	1,517	1,516	1,515	1,504	1,503	1,502	1,501
64	1,736	1,671	1,664	1,662	1,659	1,657	1,655	1,654	1,646	1,643	1,641	1,64
65	1,702	1,625	1,619	1,618	1,615	1,612	1,61	1,607	1,603	1,598	1,594	1,593
66	1,134	1,095	1,091	1,09	1,086	1,084	1,082	1,08	1,079	1,075	1,073	1,072
67	1,467	1,393	1,386	1,383	1,38	1,379	1,37	1,367	1,362	1,361	1,36	1,36
68	1,251	1,2	1,198	1,197	1,196	1,194	1,19	1,186	1,18	1,179	1,178	1,178
69	1,75	1,58	1,574	1,57	1,565	1,562	1,56	1,559	1,553	1,55	1,543	1,542
70	1,261	1,198	1,186	1,18	1,178	1,176	1,172	1,169	1,164	1,164	1,163	1,162
71	1,793	1,742	1,735	1,734	1,732	1,732	1,731	1,73	1,727	1,72	1,717	1,716
72	1,047	0,983	0,976	0,97	0,968	0,967	0,965	0,963	0,959	0,955	0,951	0,95
73	1,261	1,198	1,189	1,176	1,174	1,172	1,17	1,168	1,164	1,162	1,16	1,15
74	0,743	0,708	0,699	0,69	0,688	0,687	0,686	0,685	0,681	0,68	0,677	0,676
75	1,299	1,245	1,239	1,23	1,228	1,226	1,223	1,21	1,205	1,205	1,204	1,203
76	1,679	1,616	1,61	1,605	1,603	1,6	1,59	1,583	1,579	1,579	1,579	1,578
77	1,43	1,401	1,394	1,392	1,391	1,39	1,385	1,382	1,377	1,374	1,37	1,36
78	1,759	1,698	1,689	1,686	1,684	1,682	1,68	1,679	1,665	1,66	1,656	1,655
79	0,98	0,888	0,879	0,87	0,865	0,864	0,86	0,857	0,853	0,853	0,852	0,851
80	1,387	1,356	1,349	1,346	1,343	1,342	1,341	1,34	1,333	1,333	1,333	1,332
81	1,448	1,378	1,367	1,36	1,357	1,356	1,35	1,348	1,344	1,343	1,332	1,332
82	1,787	1,682	1,675	1,67	1,669	1,66	1,659	1,656	1,646	1,646	1,646	1,645
83	1,276	1,237	1,235	1,234	1,232	1,23	1,229	1,222	1,214	1,214	1,214	1,213
84	1,325	1,27	1,267	1,265	1,262	1,261	1,26	1,25	1,244	1,244	1,244	1,244
85	1,094	1,013	1,006	0,996	0,994	0,993	0,992	0,99	0,983	0,98	0,969	0,968
86	1,546	1,465	1,458	1,449	1,448	1,446	1,444	1,44	1,438	1,43	1,429	1,428
87	1,255	1,15	1,141	1,14	1,131	1,13	1,128	1,126	1,12	1,12	1,107	1,107
88	1,316	1,255	1,249	1,248	1,245	1,24	1,23	1,225	1,213	1,212	1,211	1,211
89	1,111	1,066	1,06	1,059	1,058	1,048	1,044	1,032	1,028	1,02	1,015	1,015
90	1,47	1,346	1,337	1,335	1,33	1,328	1,325	1,323	1,318	1,31	1,307	1,306
91	1,447	1,426	1,425	1,424	1,421	1,419	1,417	1,415	1,412	1,41	1,408	1,407
92	1,883	1,784	1,78	1,779	1,777	1,777	1,777	2	1,778	1,77	1,745	1,744
93	0,864	0,84	0,838	0,836	0,834	0,833	0,832	0,83	0,827	0,825	0,821	0,821
94	1,354	1,32	1,312	1,308	1,306	1,304	1,302	1,3	1,294	1,292	1,291	1,29
95	1,187	1,175	1,163	1,16	1,148	1,146	1,145	1,144	1,149	1,14	1,136	1,135
96	1,101	1,071	1,063	1,062	1,06	1,058	1,054	1,051	1,048	1,045	1,043	1,043
97	1,419	1,388	1,376	1,369	1,367	1,365	1,362	1,359	1,357	1,355	1,35	1,35
98	1,458	1,428	1,421	1,42	1,415	1,413	1,412	1,411	1,402	1,39	1,389	1,389
99	0,854	0,832	0,821	0,82	0,81	0,81	0,809	0,808	0,805	0,803	0,801	0,8
100	0,939	0,908	0,892	0,88	0,876	0,874	0,872	0,87	0,868	0,866	0,86	0,86
	1 semanas	2 semanas	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas	7 semanas	8 semanas	9 semanas	10 semanas	11 semanas	12 semanas

Tabela 2 – Kruskal-Wallis – $\Delta\%$ da massa das amostras

DELTA PERCENTUAL DOS VALORES DAS MASSA COM RELAÇÃO AS SEMANAS NO GRUPOS											ANALISE DE VARIANCIA DE FRIEDMAN	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
X	0,03	0,4	0,63	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	7,62	8,34	8,26	13,28	13,4	13,62	13,76	14,23	14,55X2	74,8691	
G2 Mi	3,6	7,5	8,2	7,9	13,2	13,25	13,45	13,55	14,15	14,55p	<0,0001	
X	4,06	8,1	8,97	9,08	9,53	9,93	10,34	10,36	10,68	10,64X2	85,2327	
G3 Mi	4,1	8,25	9,15	9,45	9,65	9,8	10,2	10,6	11,1	11,1p	<0,0001	
X	4,25	8,65	9,68	10,25	15,66	15,97	16,29	16,59	17,21	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	10,67	12,05	12,89	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	

Analise de Variância de Kruskal Wallis		
Delta percentual G1 X G2 X G3 X G4 X G5	Hcalc	P
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 2	29,9829	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 3	32,2844	<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	32,6774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 7	32,7563	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 8	32,6774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 9	32,6774	<0,0001
DELTA PERCENTUAL DA SEMANA 10	32,9144	<0,0001

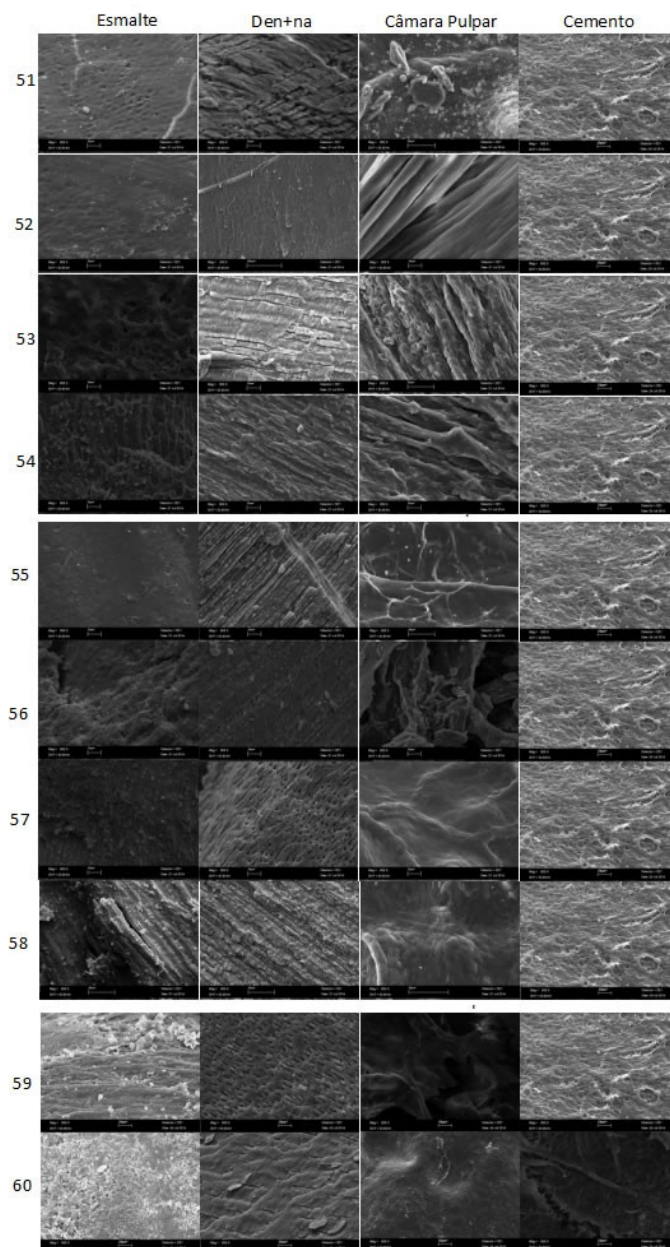


Figura 32 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo calor seco, GD1 (51-60) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.

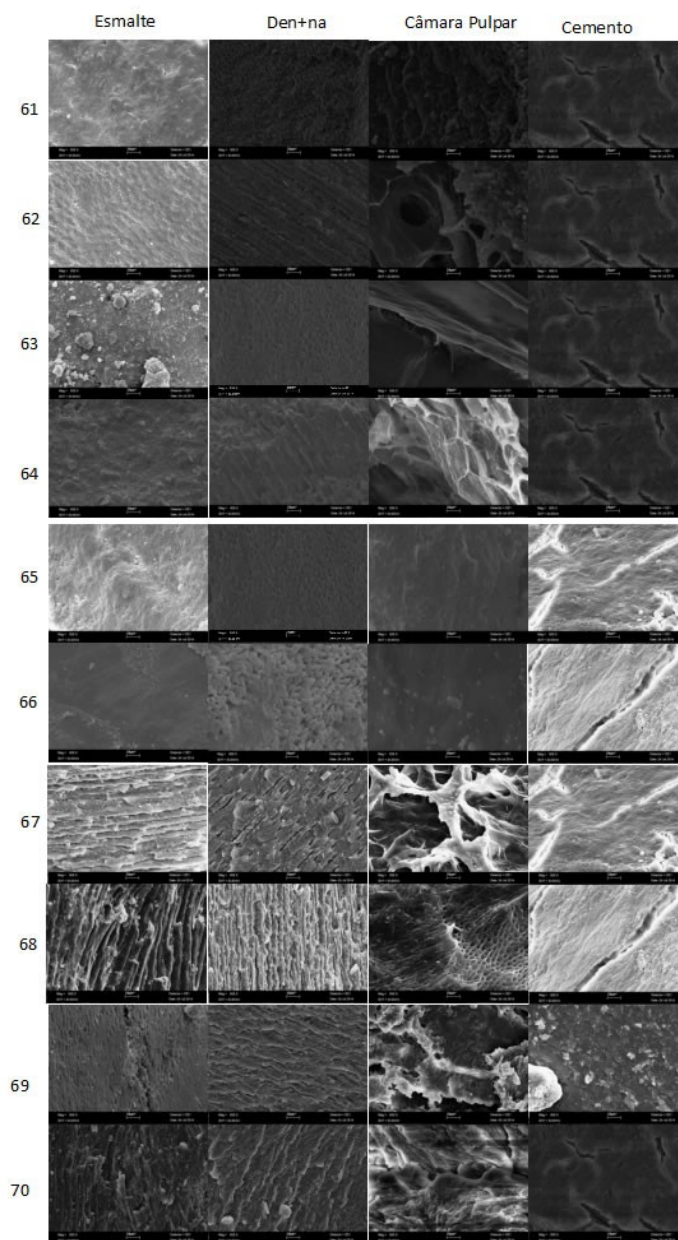


Figura 33 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo calor úmido, GD2 (61-70) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.

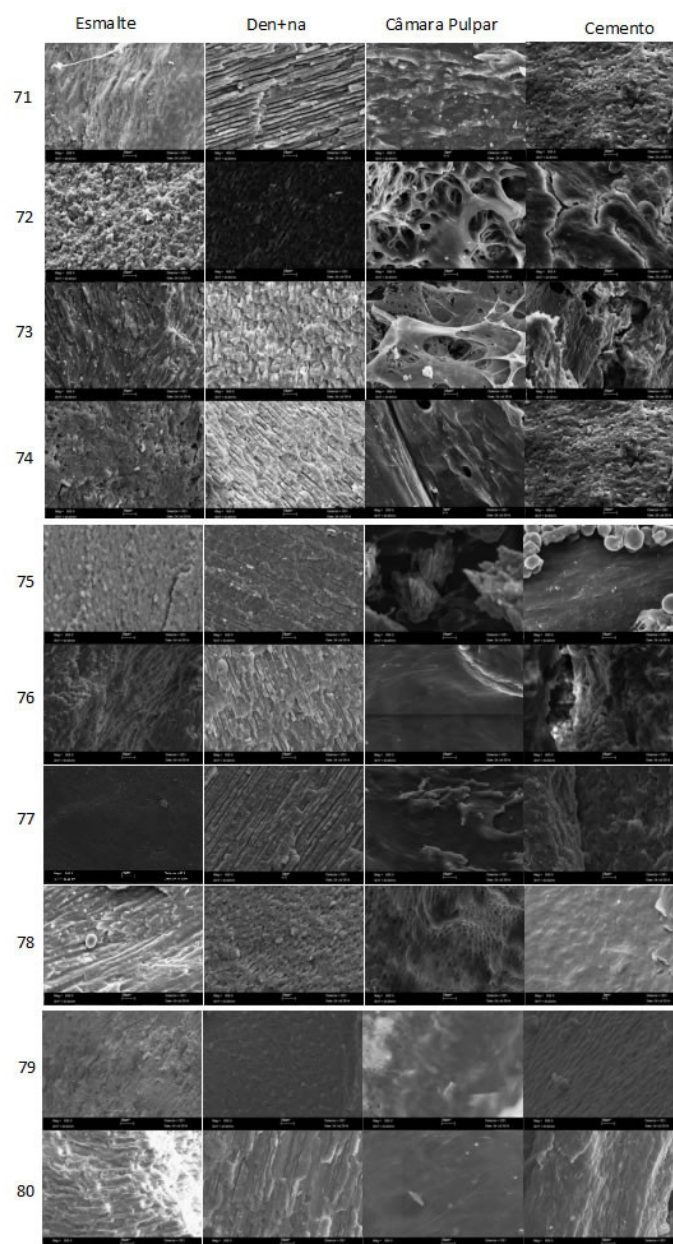


Figura 34 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo óxido de etileno, GD3 (71-80), analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.

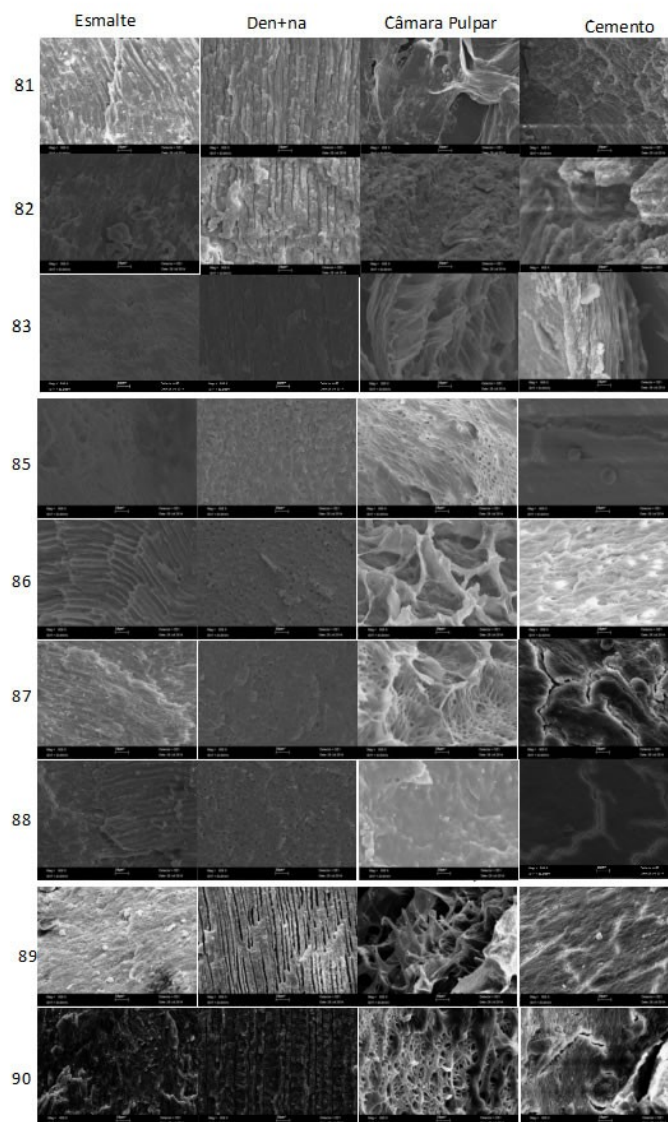


Figura 35 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo controle descelularizado, GD4 (81-90) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.

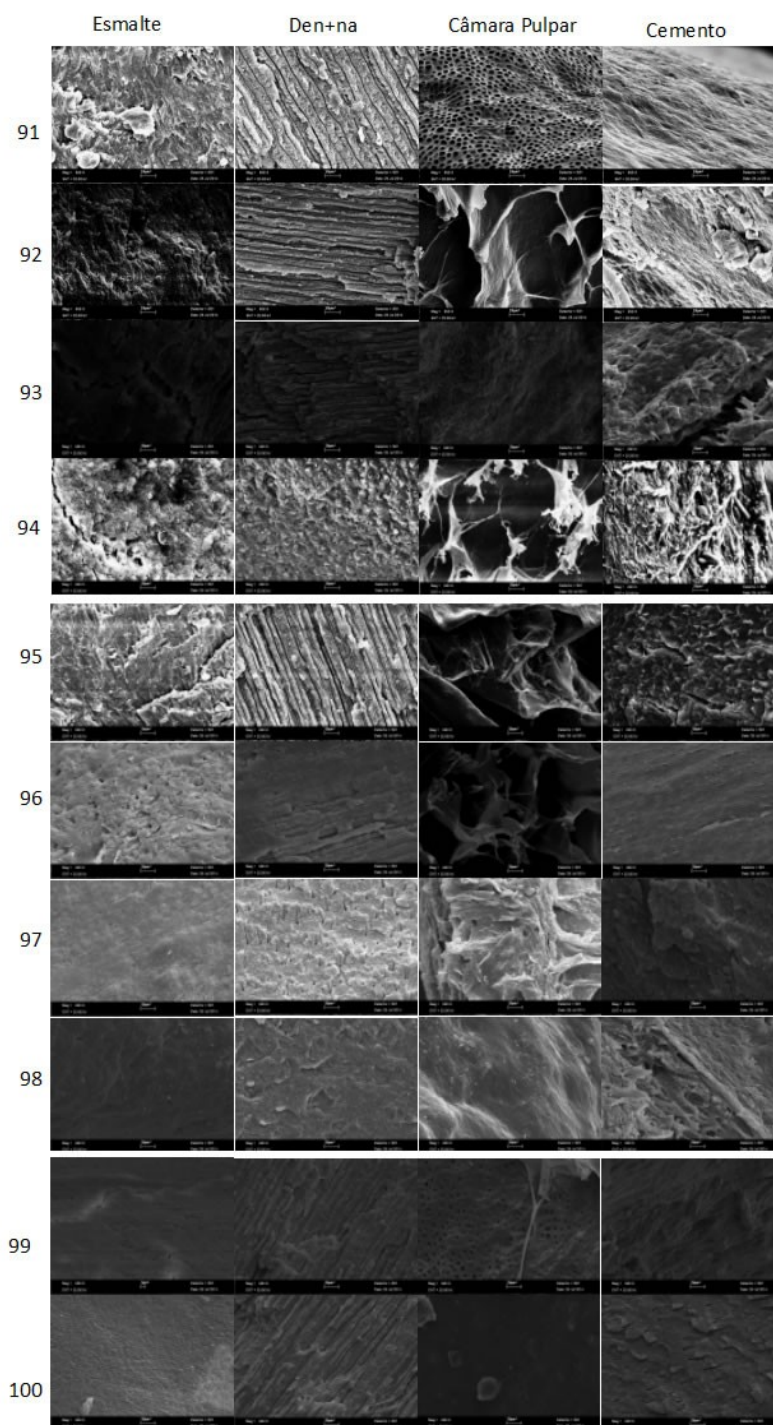


Figura 36 - Imagem de Microscopia eletrônica de Varredura dos dentes do grupo radiação gama, GD5 (91-100) , analisados no critério esmalte, dentina, polpa e cimento.

APÊNDICE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1 – TÍTULO DA PESQUISA – MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO PARA *BIOSCAFFOLD* USADO EM ENGENHARIA TECIDUAL

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 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO PARA SCAFFOLD NATURAL USADO EM ENGENHARIA TECIDUAL. Eu discuti com a Dra. Luciana Aparecida de Sousa Iwamoto 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 utiliza-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 com dentes realizado 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

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.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral das Unidades Hospitalares Próprias do Rio de Janeiro, Brasília: ministério da Saúde, 2001. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_gerais_central_esterilizacao_p2.pdf

Padilha, A..Resoluções CNS 196/96
http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/23_out_versao_final_196_encep2012.pdf

Portaria Interministerial Ms/Met No 482, De 16 De Abril De 1999
http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/portaria_482.pdf

Crystallography: Inorganic Crystal Structure Data base
<https://ucsd.libguides.com/crystallography/icsd>