



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
(PPGO) - MESTRADO



ELEN MARIANE DAL BOSCO KLEIN

POTENCIAL DA FIBROÍNA DE SEDA NA ENGENHARIA DO TECIDO  
PULPAR

Cascavel-PR  
2019

ELEN MARIANE DAL BOSCO KLEIN

## Potencial da fibroína de seda na engenharia do tecido pulpar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Área de concentração: Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Christian Giampietro  
Brandão

Cascavel-PR  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Klein, Elen Mariane Dal Bosco  
POTENCIAL DA FIBROÍNA DE SEDA NA ENGENHARIA DO TECIDO  
PULPAR / Elen Mariane Dal Bosco Klein; orientador(a),  
Christian Giampietro Brandão, 2019.  
43 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia, 2019.

1. Fibroína de Seda. 2. Tecido pulpar. 3. Engenharia de  
Tecidos. 4. Capeador da Polpa. I. Brandão, Christian  
Giampietro . II. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65  
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110  
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

## ELEN MARIANE DAL BOSCO KLEIN

Potencial da Fibroína de Seda na engenharia do tecido pulpar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Materiais Dentários Aplicados À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) Christian Giampietro Brandão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Gladson Ricardo Flor Bertolini

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Lucila Piasecki

State University of New York at Buffalo

Cascavel, 29 de julho de 2019

## **DEDICATÓRIA**

Para o meu filho Orlando: eu quero que você acredite do fundo do seu coração que você pode realizar qualquer coisa que quiser. Que você nunca vai perder: ou você ganha, ou você aprende. Vá em frente e mire nos céus.... Eu não posso te prometer estar aqui durante o resto da sua vida, mas eu prometo te amar pelo resto da minha.

## **AGRADECIMENTOS**

Grata a Deus, pelos olhos cuidadosos em cada detalhe.

Aos meus pais Rozeli e Mário, ao meu irmão Alan, por serem cais, e assim eu navegar tranquila.

Ao meu esposo Luan, por acreditar com orgulho que eu posso, junto de seus pais que me apoiam como filha.

Ao meu orientador Prof. Dr. Christian por me guiar nessa incrível jornada.

Às minhas amigas Camilla, Adriana e Cleuciane por dividirem comigo as dores e as doçuras.

À Marlene, um espírito evoluído que tive a honra de conhecer.

Aos colegas, professores e funcionários da Unioeste Campus de Cascavel e Campus de Toledo pela oportunidade, disposição e ensinamentos.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você anda” (Josué 1:9).

## Potencial da fibroína de seda na engenharia do tecido pulpar

### RESUMO

A bioengenharia estuda a incorporação de materiais alternativos naturais que apresentem excelentes biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade e propriedades físicas que simulem o ambiente *in vivo*, favorecendo a reparação, substituição ou melhoria de tecidos danificados. Uma proteína proveniente do casulo do bicho-da-seda, a fibroína, apresentou, em pesquisas recentes, resultados promissores no que tange à cicatrização, regeneração e atenuação da resposta inflamatória, além de ter sido mencionada como excelente substituto do colágeno. Suas propriedades permitem crescimento de neurônios e conexões axonais. Funções estas que criam uma nova opção de uso a este material produzido em larga escala no Brasil. A engenharia tecidual surge como alternativa ao tratamento usual e pode criar um novo protocolo incorporando a fibroína dentre os materiais de aplicações na odontologia, que visam regeneração e não reparação. Há evidências de que a fibroína é um *scaffold* seguro e eficiente, tendo propriedades mecânicas e biológicas que representam uma possibilidade de regenerador tecidual de uso odontológico para constituir uma alternativa viável no tratamento de exposições pulpares. Este trabalho teve como objetivo compilar, organizar e expor artigos científicos publicados nas bases de literatura, que testaram a fibroína de seda em tecidos e/ou células compatíveis com o encontrado no complexo dentina/polpa, compreendendo estudos que analisaram sua interação com diversos tecidos vivos, visando aqueles com semelhança aos encontrados na polpa: ósseo, conjuntivo frouxo, nervoso, além de células isoladas: fibroblastos e osteoblastos. Trata-se de uma revisão bibliográfica baseada em periódicos pesquisados nas seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE) e Portal CAPES, no período de março de 2017 junho de 2019. A literatura compulsada apresentou embasamento científico consistente do potencial regenerador da fibroína e da necessidade de pesquisas serem realizadas para comparação e possível efetivação da mesma como alternativa dentre as opções de materiais odontológicos com grande potencial biológico.

**Palavras-chave:** Engenharia tecidual, Arcabouço, Fibroína de Seda, Biomateriais, Regeneração Dental.

## Potential of silk fibroin in pulp tissue engineering

### ***ABSTRACT***

Bioengineering studies the incorporation of natural alternative materials that exhibit excellent biocompatibility, bioactivity, absence of toxicity and physical properties that simulate the environment *in vivo*, favoring the repair, replacement or improvement of damaged tissues. A protein from the cocoon of the silkworm, fibroin, has shown promising results in healing, regeneration and attenuation of the inflammatory response in recent research, and has been mentioned as an excellent substitute for collagen. Its properties allow growth of neurons and axonal connections. These functions create a new use option for this material produced in large scale in Brazil. Tissue engineering emerges as an alternative to the usual treatment and can create a new protocol incorporating fibroin among materials of applications in dentistry, aimed at regeneration and non-repair. There is evidence that fibroin is a safe and efficient scaffold, having mechanical and biological properties that represent a possibility of tissue regenerator for dental use to constitute a viable alternative in the treatment of pulp exposures. The objective of this work was to compile, organize and present scientific articles published in literature databases that tested the silk fibroin in tissues and / or cells compatible with that found in the dentin / pulp complex, including studies that analyzed its interaction with several living tissues, aiming at those with similarities to those found in the pulp: bone, loose connective, nervous, in addition to isolated cells: fibroblasts and osteoblasts. This is a bibliographical review based on journals researched in the following databases: Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (LILACS), Brazilian Bibliography of Dentistry (BBO), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE) and Portal CAPES, in the period of March 2017 June 2019. The literature has presented a consistent scientific basis of the regenerative potential of fibroin and the need for research to be carried out for comparison and possible effectiveness of the same as an alternative among the options of dental materials with great biological potential.

***Keywords:*** Tissue Engineering, Scaffold, Silk Fibroin, Biomaterials, Tooth Regeneration.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Referências utilizadas na avaliação das propriedades da fibroína e do capeador pulpar ideal .....	36
--	----

Dissertação elaborada e formatada conforme  
as normas das publicações científicas:

Brazilian Dental Journal (artigo 1)

Disponível em:

<http://www.scielo.br/revistas/bdj/pinstruc.htm>

## SUMÁRIO

1. Introdução :.....	12
2. Objetivo geral :.....	15
2.1 Objetivos específicos:.....	15
3. Metodologia:.....	16
4. Revisão de Literatura :.....	17
4.1 Regeneração de tecido ósseo .....	19
a. <i>in vitro</i> .....	19
b. <i>in vivo</i> .....	20
4.2 Regeneração endotelial.....	23
a. <i>In vitro</i> .....	23
b. <i>In vivo</i> .....	25
4.3 Regeneração de tecido nervoso .....	25
a. <i>In vitro</i> .....	25
b. <i>In vivo</i> .....	27
4.4 Capacidade hemostática .....	30
a. <i>In vivo</i> .....	30
4.5 Regeneração pulpar .....	32
a. <i>In vivo</i> .....	32
5. Discussão :.....	34
6. Conclusão :.....	38
7. Referências bibliográficas : .....	39

## 1. Introdução

Biomateriais na odontologia são materiais naturais ou sintéticos utilizados em contato com sistemas biológicos que agem reparando ou substituindo tecidos, órgãos ou funções do organismo a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente. Sua utilização segura requer três características básicas: (1) biocompatibilidade, não induzindo respostas biológicas adversas, como reações alérgicas e inflamatórias não toleráveis pelo organismo; (2) alta osteoindutividade, estimulando o crescimento de células ósseas; e (3) bioatividade, que é a capacidade do material em se unir com tecido biológico (1).

A ciência que estuda técnicas de incorporação de biomateriais aos tecidos humanos se chama Engenharia Tecidual. Ela pode se subdividir de três formas, que delimitam estratégias: Indutiva, Condutiva e Transplantação Celular, sendo que a primeira consiste na aplicação de fatores de crescimento teciduais, a segunda na implantação de biomateriais e a terceira na implantação de células totipotentes (2). Em Odontologia, há uma grande variedade de aplicações: osso alveolar, ligamento, esmalte, dentina e polpa. A modalidade terapêutica mais conhecida nesse ramo é a utilização de células embrionárias provenientes da polpa dental, semeadas em *scaffolds biodegradáveis* - estruturas porosas tridimensionais que servem de molde para o crescimento celular. A Engenharia tecidual surge como alternativa ao tratamento usual e pode criar um novo protocolo odontológico, que vise regeneração e não reparação (3,4).

No contexto da endodontia, quando tecidos pulpares são expostos ao ambiente da mucosa oral, é necessário que se realize a proteção direta do complexo dentina-polpa, preservando sua vitalidade (5). Tal tratamento propõe a recuperação daquele tecido mediante o uso de medicação que induza produção de tecido mineralizado (6), sendo que o hidróxido de cálcio tem sido o material de escolha geralmente aceito (7). A utilização dos biomateriais é fundamental por reunirem propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antibióticas, que podem induzir a formação de dentina reparadora. Embora o Hidróxido de cálcio tenha limitações, como por exemplo, a formação de barreira mineral incompleta, não uniforme e produza uma osteodentina porosa (8,9), o que ressalta a necessidade do desenvolvimento de novos materiais.

Dentre os biomateriais testados que apresentem excelentes resultados e são utilizados para este fim, como o Mineral Trióxido Agregado (MTA), duas proteínas produzidas pelas glândulas especializadas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) têm despertado a atenção dos pesquisadores: os polímeros proteicos fibroína (proteína fibrosa) e sericina (cola de proteína). Ambas exibem propriedades mecânicas e químicas comparadas a proteínas globulares (um dos

principais grupos de proteínas do corpo humano), e por esse motivo, sua aplicação e controle genético têm sido estudados no campo da biomedicina (10,15).

A fibroína, é um polímero natural que foi aprovado para uso médico pela associação norte americana *Food and Drug Administration (FDA)*. Pesquisas *in vitro* têm demonstrado seu potencial modificador e revelado sua afinidade quando combinadas com células de tecidos humanos. Características como a boa estabilidade físico-química, alta permeabilidade ao oxigênio resistente, flexibilidade e fácil manipulação a colocam como um material promissor para a engenharia de tecidos, área que vem estudando sua aplicação em osso, cartilagem, ligamento, entre outros (12-15).

Outro aspecto ser destacado sobre a fibroína é o econômico. Há décadas a sericultura (atividade de desenvolvimento sustentável com muito baixo impacto no meio ambiente) tem como principal destino de sua produção a indústria têxtil e fabricação de fios de sutura (16,57), e o Brasil é o quinto país do mundo na produção de fios de seda (a granel) (Paraná produziu cerca de 4,5 mil toneladas em 2009, totalizando 92,17% da produção nacional) (BNDS) (56).

Considerando que a produção nacional da seda é expressiva e que a aplicação em pesquisas da fibroína ampliou-se nos últimos anos, entendemos que ela poderia ser aproveitada (e não descartada) e empregada como um material odontológico de resultados promissores na endodontia em função de suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Porém, como ainda não há evidência científica sobre o desempenho destes biomateriais sobre o tecido pulpar, este trabalho de revisão bibliográfica abordará o uso da fibroína em diversas áreas da saúde e discutirá sobre o potencial da mesma para atuar como um regenerador tecidual a ponto de ser considerada uma alternativa viável no tratamento de exposições pulpares.

Um estudo feito por Hartmann e colaboradores (2018) (17) norteia o uso das propriedades benéficas do casulo do bicho-da-seda em tecido pulpar. Este é o primeiro estudo que utiliza Sericina (proteína também encontrada no casulo, que possui propriedades biocompatíveis) para capeamento pulpar em dentes de ratos. Foram feitos acessos circulares, com auxílio de broca odontológica esférica carbide e microscópio, até verificar sangramento. A hemostasia foi feita com cones de papel absorvente e o material inserido dentro da cavidade com auxílio de aplicador de MTA (Angelus, Londrina-PR-Brasil), seladas com Ionômero de Vidro Ketac Molar (Easymix, 3M). O grupo controle continha Hidróxido de Cálcio sob as mesmas condições. Os animais foram testados em 7 e 30 dias, quando ressecaram as maxilas, condicionaram as peças em HE e visualizaram em microscópio. Foram observadas reações

inflamatórias de grau leve a médio e presença de células imunes. Mais estudos como este são necessários para esclarecer os benefícios do uso dos subprodutos do casulo do bicho-da-seda.

## **2. Objetivo geral**

Apresentar estudos disponíveis nas bases literárias sobre o potencial uso da proteína fibroína de seda, em pesquisas aplicadas na Odontologia de biomateriais.

### **2.1 Objetivos específicos**

- a.** Levantar dados bibliográficos no período de março de 2017 a junho de 2019 das aplicações da fibroína na engenharia tecidual;
- b.** Verificar as potencialidades da proteína da seda na área odontológica, especificamente dos elementos encontrados na polpa dentária;
- c.** Analisar estudos que apresentem as aplicações da fibroína na engenharia tecidual.

### 3. Metodologia

Esta revisão da literatura se baseia em artigos científicos nacionais e internacionais sobre a utilização de fibroína de seda e seu efeito sobre a polpa. Já que o uso da proteína é um assunto novo, serão explorados os primeiros estudos que relatam sua utilização, bem como aqueles recentes que abordem sua associação a outros polímeros, tanto quanto aspectos de seu mecanismo de ação foram utilizados.

Os estudos utilizados foram retirados das seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Bibliografia *Brasileira de Odontologia* (BBO), *Scientific Eletronic Library Online* (SCIELO), *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e Portal CAPES. O levantamento de dados foi realizado no mês de março de 2017 a junho de 2019.

Para a elaboração da revisão, as seguintes etapas foram percorridas: definições de critérios de inclusão e exclusão de artigos, definições das informações a serem utilizadas a partir dos artigos definidos e análise dos resultados.

Os critérios de inclusão foram: artigos em português e inglês acerca da temática citada acima e textos na íntegra indexados no período de 1960 a 2019. Abrange estudos *in vitro* e *in vivo*, aprovados pelos respectivos comitês responsáveis, registrados e publicados, cuja amostra utilize fibroína de seda pura ou biocompostos, por abordagens quantitativas e qualitativas.

Consequentemente, os critérios de exclusão são: relevância do estudo, confiabilidade e replicabilidade da metodologia científica, compatibilidade da análise de dados com a população estudada, estudos destinados puramente a ensaios mecânicos de tração, coloração para revelar morfologia, conformação ou propriedades físicas, estudos onde não haja interações com tecidos e/ou células, métodos de extração da proteína.

#### 4. Revisão da Literatura

Vários tipos de danos podem ser causados ao complexo dentina-polpa, dentre eles: trauma e cárie, sendo que as cavidades formadas podem ter diversos níveis de profundidade, resultando em uma simples restauração ou, mais invasivamente, tratamento endodôntico (conservador ou radical). O capeamento pulpar direto, por definição, é o procedimento que envolve a remoção da porção inflamada da polpa e visa prevenir que evolua para uma infecção e, até mesmo, necrose. Representa a única opção clínica que permite manter a vitalidade da polpa mesmo frente a lesões profundas. Dentre os materiais indicados para essa terapia, o hidróxido de cálcio tem sido claramente o material de escolha, pois permite a diferenciação de células capazes de produzir uma barreira mineral (18-20). A endodontia clínica contemporânea visa terapias baseadas em preservar a polpa com vitalidade sustentada, prevenindo a periodontite apical (*European Society of Endodontology – Duncan et al. 2019*) (21). Estratégias de pesquisas pretendem superar as limitações dos materiais e intervenções clínicas que possibilitem ao complexo dentina-polpa se regenerar utilizando-se de biomateriais com a função de *scaffolds*. Há uma série de polímeros inovadores com potencial para regeneração da polpa (22).

O tratamento bem-sucedido da polpa mantendo-a vital deve induzir formação de ponte dentinária, para posterior cicatrização do tecido, e este mecanismo baseia-se na substituição de odontoblastos danificados por células tronco derivadas da porção saudável da polpa. Huang et al. (2010) (23) estudaram células tronco mesenquimais e células tronco da papila dental de terceiros molares humanos que foram cultivadas em meio de soro bovino, sendo realizadas diferenciações de linhagens múltiplas: odontogênica, adipogênica, neurogênica e potencial miogênico, sendo analisadas por microscópio de fluorescência. *Scaffolds* copolímeros de poli-D, L-láctico e glicolido foram fabricados e tiveram as citadas células semeadas em sua estrutura porosa. Foram processados estudos padrão de histologia e microscopia eletrônica de varredura para verificar fixação e morfologia. Então, as amostras foram inseridas em tecido subcutâneo de ratos, e após processadas, foram observadas em microscopia ótica, sendo observados depósitos de dentina reparadora e células embutidas nesta estrutura eram semelhantes a odontoblastos.

O tecido mineral recentemente depositado aderiu-se bem à dentina original. Para verificar se as células geradas no novo tecido eram de origem humana, anticorpos para mitocôndrias foram utilizados e as células foram coradas positivamente, comprovando-se a

semelhança do tecido regenerado ao natural. Este estudo representa a primeira evidência *in vivo* demonstrando síntese de dentina por tecido pulpar humano, revelando que a utilização de *scaffolds* como matriz de regeneração parece ser bem-sucedida.

Entre as variedades de materiais que vêm sendo estudadas na Engenharia de Tecidos, destaca-se a fibroína de seda, polímero natural extraído do casulo da *Bombyx Mori*. A seda é utilizada como material para sutura há séculos. Segundo Kasoju & Bora (2012) (24), há muita acessibilidade à matéria prima e seu processamento é simples. Após a degomagem, obtida pelo cozimento dos casulos em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , e lavagem em água destilada, a fabricação de *scaffolds* pode ser explorada em filmes, matrizes porosas, hidrogéis, fios organizados ou desorganizados, entre outros. Seu processo de degradação pode ter o tempo alterado e o material exibe propriedades biocompatíveis com pele, ossos, cartilagem, ligamentos, entre outros. etc. Pesquisadores têm testado materiais híbridos entre fibroína e materiais inorgânicos (ex.: hidroxiapatita) e orgânicos (ex.: colágeno) e tem obtido notável progresso.

A escolha de um *scaffold* para regeneração pulpar deve obedecer a estrutura e função desse tecido complexo e peculiar. A polpa é um tecido conjuntivo frouxo, extremamente vascularizado e inervado. É responsável pela nutrição e função sensorial dos dentes. As células mais proeminentes são os fibroblastos, mas também são encontrados macrófagos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas e os odontoblastos (estando seus corpos celulares localizados na dentina, e estendendo seus prolongamentos para a polpa). Possui como elemento essencial a presença de axônios, contendo os dois tipos de fibras sensoriais. Ela é semelhante a outros tecidos conjuntivos, mas tem a interessante característica de que, mesmo quando madura, é fonte relativamente rica de células tronco, tornando o potencial de reparo e regeneração uma realidade (7).

A fibroína é a fibra da seda e é feita de glicina, alanina, serina, tirosina e outros aminoácidos residuais. Composta de regiões altamente organizadas com folhas- $\beta$  e semicristalina que a conferem elasticidade. Os resíduos de hidroxila (serina e tirosina) promovem afinidade com a água, alta permeabilidade ao oxigênio e vapor d'água (25). O método de extração é relativamente simples: a solução de fibroína é feita com a remoção da sericina. Após obtidos os casulos, eles são picados em moinho de facas, passado por solução ternária de  $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$  (1:2:8 moles) e a suspensão obtida é mantida em 60 °C em banho termostatizado até dissolução completa. O líquido é então dialisado, para retirar o máximo de cloreto de cálcio e EtOH, purificando a amostra. Ela então é borrifada em nitrogênio líquido para a formação de micropartículas, então liofilizadas para obtenção de pó (26). Um

*scaffold* deve ter estrutura porosa, para que o cultivo de células e fatores de crescimento aconteça adequadamente. Os poros permitem o tecido crescer em grande área superficial e garante a vascularização. Eles contribuem para um ambiente tridimensional com interação de células e da matriz, tendendo a uma melhor migração e adesão celular (27).

Tendo em vista as informações acima, e as células e elementos encontrados no complexo dentina-polpa, esta revisão será subdividida em: regeneração de tecido ósseo, regeneração endotelial, regeneração de tecido nervoso, capacidade hemostática e regeneração da polpa propriamente dita.

#### **4.1 Regeneração de tecido ósseo**

##### **a. *In vitro***

Cai et al. (2002) (13) avaliaram as propriedades da fibroína de bicho-da-seda em uma análise *in vitro* com o objetivo de obter um novo copolímero de interesse para uso em arcabouço para células regeneradoras. Após produzirem uma membrana de Poli L-Ácido Lático (PLLA) (material de grande interesse na engenharia de tecidos por ser um polímero biodegradável e bioabsorvível) modificada com fibroína, ela foi inserida em uma cultura de osteoblastos de rato, avaliando a morfologia, adesão e proliferação celular, bem como sua viabilidade, comparando ao grupo controle, formado por uma membrana sem a superfície modificada. A película modificada foi mais adequada que a controle, evidenciando que a fibroína poderia ser eficiente para aumentar a afinidade celular de um biomaterial.

Woloszyk et al. (2014) (28) realizaram um estudo com *scaffolds* de fibroína de seda semeados com células-tronco da polpa dentária humana. Eles foram cultivados em dois tipos de ambiente: a) mecanicamente dinâmico rotativo (reatores de frascos giratórios) ou b) estático. Foram formados 4 grupos: 1) *scaffold* dinâmico em meio de soro bovino fetal, 2) *scaffold* dinâmico em meio de osteoblastos (osteogênico), 3) *scaffold* estático em soro bovino fetal, 4) *scaffold* estático em osteoblastos. O desenvolvimento das células-tronco da polpa foi avaliado em tomografias computadorizadas ao de final de cada semana. Após 47 dias de cultura, os *scaffolds* foram pesados e processados para análise de proliferação celular (a partir da análise de DNA), viabilidade (por fluorescência) e potencial osteogênico (calculado por ensaios de fosfatase alcalina). Também foi realizada análise histológica as colorações de HE e Von Kossa (VK). A coloração de VK confirmou a presença de fosfato em todos os grupos. A mineralização foi significativamente maior, mais homogênea, e com maior expressão gênica para o cultivo

em ambiente dinâmico/meio osteoblasto. O ambiente rotativo promoveu melhor espalhamento de células nos dois grupos teste. A coloração de HE confirmou o melhor espalhamento das células nas amostras de ambiente dinâmico. A quantidade de células e matriz extracelular foi menor nos dois grupos cultivados em meio de soro bovino, quando comparada com grupos cultivados em meio repleto de osteoblastos. Os autores concluíram que *scaffolds* de fibroína/células-tronco promovem melhor formação de matriz mineralizada em cultivo dinâmico e meio osteogênico.

Lee et al. (2018) (29) avaliaram a eficácia de um arcabouço biocomposto por fibroína e colágeno sobre células pré-osteoblásticas de camundongos, comparando com o uso de colágeno puro. Primeiramente a morfologia do arcabouço foi analisada por MEV. A seguir, cultivaram as células (em soro bovino) para induzir diferenciação osteogênica; as viáveis foram coradas e analisadas em microscópio de fluorescência (MF) sob os seguintes critérios: atividade da fosfatase alcalina, mineralização de cálcio, núcleos viáveis e citoesqueleto de actina. Os autores observaram que, após aplicação do material sobre as células dos camundongos, as mesmas continuaram viáveis. Além disso, a deposição de cálcio foi de 9,7 a 10,3 vezes maior e houve aumento na mineralização óssea (comparado ao colágeno puro), mostrando a capacidade de indução de desenvolvimento significativo de citoesqueleto. Os autores concluíram que o biocomposto de fibroína apresentou maior resistência física e boa propriedade comparadas com o arcabouço de puro colágeno.

## **b. *In vivo***

Meinel et al. (2005) (30) criaram um *scaffold* poroso de fibroína e semearam células isoladas tronco mesenquimais humanas. Cirurgicamente, criaram um defeito de 4 mm na calvária de camundongos, com auxílio de broca odontológica. Dividiram aleatoriamente os animais em quatro grupos: o primeiro, recebeu implante ósseo, o segundo, o *scaffold* semeado de células, o terceiro apenas o *scaffold* e o último formou o grupo controle negativo, pois não obteve o defeito preenchido. Os animais foram eutanasiados cinco semanas após a cirurgia e tiveram seus crânios dissecados, passados por tomografia computadorizada, para posterior análise em microscópio. Radiograficamente, animais do grupo controle negativo e animais que tiveram o defeito preenchido apenas com o *scaffold* não tiveram mineralização. As evidências histológicas apoiaram esses achados, onde encontraram substancial formação óssea nas áreas de enxerto de osso e de *scaffold* semeado com células. O efeito da presença das células

reparadoras no implante fornece evidências de que a nova formação óssea era influenciada pelo recrutamento de células hospedeiras circundantes. Juntamente com as propriedades mecânicas, durabilidade e integridade da fibroína, essa associação/analogia de componentes inorgânicos e orgânicos, expande significativamente o futuro desse material.

Meinel et al. (2006) (11) cultivaram, em meio osteogênico, células-tronco mesenquimais humanas e células mesenquimais indiferenciadas e as semearam em *scaffold* de fibroína. Após obtido o material, criaram cirurgicamente um defeito ósseo longo em fêmur de camundongos. Quatro grupos de tratamento foram avaliados: (1) enxerto de *scaffold* com células tronco previamente diferenciadas ao longo de uma linhagem osteoblástica *in vitro*, (2) enxerto de *scaffold* com células indiferenciadas, (3) apenas o *scaffold*, (4) defeitos não preenchidos. Os animais foram sacrificados 56 dias após a cirurgia sendo, então, realizadas as tomografias computadorizadas e as análises histológicas e imunohistoquímicas, observando-se os seguintes resultados: o grupo 1 obteve boa integração do implante com o osso e nova formação óssea substancial foi observada., embora tenham avistado células de corpo estranho. Nenhum sinal aparente de degradação da fibroína. O grupo 2 apresentou formação de osso apenas nas bordas do defeito, não atingindo o centro da lesão e apresentou células de corpo estranho. Novamente, nenhum sinal de degradação no *scaffold*. A interação do enxerto com o hospedeiro foi mais fraca no grupo 3 do que nos dois primeiros, mas houve a formação de uma rede celular densa em torno do defeito. No grupo 4, encontraram apenas aglomerados de células não formadoras de osso, que apresentaram marcadores para colágeno tipo I. Dos seis ratos do primeiro grupo, 50% tiveram preenchimento completo do defeito, sem formação de rachaduras, semelhante ao cortical, caracterizando o melhor resultado.

A fibroína provou ser biocompatível e oferecer boas condições mecânicas. Acredita-se que as células-tronco são uma fonte interessante na engenharia de tecidos, particularmente objetivando-se a geração de osso, pois tem alta capacidade de proliferação e diferenciação de multilinhagem. A linhagem composta por células em meio osteogênico gerou alto grau de mineralização.

Zhao et al. (2009) (31) obtiveram 14 cães mestiços adultos dos quais colheram, por punção, 4 mL de medula óssea autóloga. Os espécimes foram cultivados em meio de soro bovino fetal. Prepararam uma solução aquosa de fibroína de seda e criaram *scaffolds* em forma de disco. Células induzidas osteogenicamente foram semeadas nos discos. Após esse procedimento, os animais foram anestesiados e a borda inferior da mandíbula foi exposta cirurgicamente. O perióstio mandibular foi cuidadosamente dissecado, com broca resfriada

continuamente por solução salina. Os defeitos eram bilaterais, tinham 2 mm x 10 mm e localizavam-se entre o forame mental e a raiz mesial do primeiro molar. Os espaços foram preenchidos por diferentes materiais: enxerto de *scaffold* puro de fibroína, enxerto semeado com células e osso autógeno ressecado. Também mantiveram um grupo como controle negativo, onde os defeitos não foram preenchidos. Obtiveram imagens radiográficas 1, 3, 6 e 12 meses após a operação, quando os animais foram sacrificados. As densidades minerais ósseas locais (DMO) foram medidas pelo software Hologic Discovery A, Bedford, MA, EUA. A mandíbula foi bissectada e analisaram a histologia e histomorfologia da regeneração óssea, usando hematoxilina e eosina, além de marcador para cálcio.

No grupo com células semeadas, a neoformação óssea teve volume e radiopacidade completas aos 12 meses. No grupo *scaffold* puro, formaram calosidades, mas falhou em cobrir completamente o defeito. O grupo auto enxerto mostrou alguma formação óssea e o grupo não tratado não reparou de forma alguma. Confirmando os achados acima, a histologia mostrou, no enxerto semeado, o local do defeito completamente preenchido sem limites óbvios entre o osso novo e o osso nativo. A fibroína perdeu completamente sua integridade estrutural nesse tempo, deixando pequenos pedaços que foram preenchidos por osso irregular. No enxerto puro, a nova formação óssea foi observada ao redor do *scaffold* residual no centro do defeito. Os poros da fibroína estavam mantidos e não estavam preenchidos por tecido. Nos outros grupos, o osso formou-se apenas na periferia. Os grupos que receberam o *scaffold* não tiveram o material completamente degradado, mas os elementos teciduais coexistiram com ele harmoniosamente, sem apresentar características inflamatórias. Em conclusão, os *scaffolds* de fibroína fornecem um ambiente osteocondutor, aumentado quando associado a células específicas, para reparar defeitos mandibulares.

O estudo *in vivo* de Riccio et al. (2012) (32) comparou o efeito do preenchimento de defeitos ósseos (cirurgicamente induzidos em crânio de ratos machos jovens) com 3 diferentes *scaffolds* de fibroína: 1) puro, 2) modificado com células-tronco isoladas de líquido amniótico humano em cultura de osteoblastos e 3) da polpa dentária, em cultura de odontoblastos (alterado com meio osteogênico). Quatro semanas após, as calvárias foram extraídas para análise histológica e radiográfica. As células tronco promoveram extensa regeneração óssea, áreas de osso compacto e organização lamelar e radiopacidade semelhantes ao intacto. Ilhas de fibroína envoltas em novo tecido mineralizado e intensa atividade de pré-osteócitos incluídos nas lacunas foram observados. Os *scaffolds* de fibroína modificados com células-tronco de ambas

as origens formaram um microambiente ideal para diferenciação osteogênica e neoformação óssea.

Ainda, Jo et al. (2017) (33) demonstraram a capacidade de regeneração óssea *in vivo* na presença de um enxerto composto por alginato, hidroxiapatita e fibroína. A nova formação óssea foi avaliada por análise histomorfométrica e por imunohistoquímica. Os enxertos que continham a fibroína apresentaram neoformação óssea superior ao grupo controle e maiores concentrações de marcadores osteogênicos. Não observaram evidências de formação de células gigantes ou qualquer reação inflamatória. Dessa forma, comprovou-se que o composto pode ser efetivo como *scaffold* na engenharia tecidual dos ossos.

## 4.2 Regeneração endotelial

### a. *In vitro*

Chiarini et al. (2003) (12) investigaram quatro cepas de fibroblastos adultos humanos normais que foram semeados em membranas de policarbonato uretano (PCU) (polímero cuja principal característica é a excelente resistência ao impacto) revestidas ou não com fibroína sobre a adesão, crescimento e desempenho metabólico. Os autores observaram adesão celular significativamente maior que o controle, maior atividade e proliferação mais intensa de fibroblastos, além da vantagem metabólica, já que os fibroblastos na presença do material modificaram utilizaram menos glicose e liberaram menos lactato e ressaltaram que o material apresenta incontestáveis vantagens, transformando o PCU modificado em uma nova classe de biomaterial.

Carvalho et al. (2016) (34), fizeram ensaios de citotoxicidade de *scaffolds* tridimensionais produzidos a partir da mistura física de hidroxiapatita (fosfato de cálcio termicamente estável que guarda grandes semelhanças com os biominerais inorgânicos do osso), com alginato ou fibroína, formando quatro grupos distintos, sobre células fibroblásticas de rato L929. As células foram cultivadas em meio de cultura de soro bovino, e os biomateriais distribuídos em placas de 24 poços. Os resultados foram coletados a partir de testes em triplicata e analisados por *software Origin*. Em nenhum dos grupos foi observado efeito citotóxico sobre a sobrevivência e adesão daquelas células. Concluíram que os biocompostos podem representar uma alternativa em engenharia tecidual para a regeneração óssea.

Arias et al. (2018) (35) prepararam filmes de fibroína de seda utilizados como *scaffolds* para cultura celular de fibroblastos humanos. Os filmes tiveram suas características estruturais

avaliadas usando microscopia eletrônica de varredura, e foram classificadas conforme sua porosidade e estabilidade, testes de resistência a tração e degradação foram realizados em diferentes temperaturas. O crescimento das células foi avaliado em caixas de cultura de poliestireno de 35mm revestidos de fibroína a 17%. A cultura começou com 48.000 Cel/ mL, mudadas a cada três dias, até que se atingisse uma confluência de 80%. As células foram destacadas utilizando tripsina e EDTA e a contagem e viabilidade foram feitas na câmara de Neubauer com uso de coloração azul supra vital do tripan. Como controle, utilizaram caixas de cultura sem revestimento de fibroína. Para confirmar a interação das células com o *scaffold* foi verificada em MEV. As películas exibiram características de transparência e translucidez, além de resistência mecânica. Em temperatura ambiente de 25°C mostraram maior resistência e ruptura do que aos 37°C. A viabilidade celular variou entre 90-95%, não houve variação na morfologia, a proliferação celular ocorreu de forma homogênea e estabeleceu forte interação com o *scaffold*.

Não houve estatística significativamente relevante em relação ao crescimento celular do controle. De acordo com os resultados, a fibroína mostrou um comportamento de um material termoplástico anisotrópico, que tem seu pico de degradação aos 21 dias. Os autores consideraram que os parâmetros encontrados em crescimento, proliferação e manutenção dos fibroblastos, cumprem os requisitos de um biomaterial adequado para uso na engenharia de tecidos.

Miguel et al. (2019) (36) desenvolveram uma membrana assimétrica à base de fibroína e caprolactona, um poliéster biodegradável, para obter uma camada com o objetivo de mimetizar a epiderme a ser produzida para cura de feridas. Por meio de um aparelho convencional de eletrofição (produz alta tensão), uma solução de fibroína, ácido fórmico e trifluoretanol foi colocada em uma seringa a uma vazão constante e uma tensão de 28 kV. A membrana resultante foi tratada com vapor de etanol a 75% e posteriormente seca em temperatura ambiente. Nelas, foram semeados fibroblastos dérmicos humanos normais e incubados a 37°. Células incubadas em eutanol 96% foram utilizadas como controle. Foram infiltradas bactérias Gram + e Gram -. A formação de biofilme na superfície foi fotografada e analisada utilizando-se o *software* Image J (Scion Corp., Frederick, MD). A membrana produziu baixa atividade antioxidante, alta sobrevivência celular na superfície da membrana e demonstraram também altas taxas de viabilidade de fibroblastos. Segundo os autores, a combinação fibroína/caprolactona reproduz com fidelidade a porosidade, molhabilidade e propriedades mecânicas corretas de um tecido para que haja cicatrização. Destacaram que, em

geral, a membrana apresenta excelente biocompatibilidade, melhora do ambiente celular, favorecimento de adesão a nanofibras.

**b. *In vivo***

Vázquez et al. (2017) (37) desenvolveram um enxerto endotelial artificial à base de fibroína de bicho-da-seda, obtendo filmes de fibroína. Primeiramente testaram as propriedades mecânicas (tração e resistência a ruptura) e medidas de transmissão de luz daqueles filmes. Então, células endoteliais da córnea de coelhos e de humanos foram cultivadas em soro bovino e fixadas aos filmes; esse conjunto (referido como enxerto) foi incubado em anticorpos primários e posteriormente em secundários. Após análise e seleção das películas, elas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), verificando que as células exibiam a morfologia hexagonal típica. A seguir, os enxertos foram transplantados para um dos olhos de coelhos saudáveis, onde não se observou nenhum sinal óbvio de rejeição imunológica em qualquer grupo. Os resultados mostraram que o enxerto permitiu a recuperação da funcionalidade endotelial, com junções intercelulares apropriadas, baixo nível de reação inflamatória, confirmando suas excelentes propriedades como biomaterial e sua ampla gama de utilização. Os autores concluíram, pela experiência *in vivo*, que filmes de fibra de seda representam um enxerto promissor em queratoplasia endotelial corneana.

### **4.3 Regeneração de tecido nervoso**

**a. *In vitro***

A associação fibroína-de-seda e melanina foi empregada para fabricação de um composto nanofibroso com propriedades neuroindutivas por Nune et al. (2019) (38). Após extraída a proteína e obtida a melanina (M0418, Sigma), foram dissolvidas em hexafluoro-2-propanol (HFIP) para obter 6 % (em peso) de concentração. O *scaffold* foi obtido através de eletrofiação, onde a solução de polímero foi carregada em uma seringa de 2 mL e a taxa de fluxo mantida em 1 mL/h, estando a ponta da seringa conectada a um tensor de 12 kV e produzindo nanofibras, coletadas em tambor rotativo que tem velocidade específica para manter as amostras estáveis e armazenadas em dessecador a vácuo. Foram produzidas quatro amostras: nanofibras aleatórias de fibroína de seda, nanofibras alinhadas de fibroína de seda, nanofibras aleatórias de fibroína e melanina e nanofibras alinhadas de fibroína e melanina. Uma linha

celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) foi cultivada e semeada nas folhas de nanofibras cortadas. A amostra foi esterilizada e teve como controle uma cultura tecidual de poliestireno. A adesão celular aos *scaffolds* foi medida por microscopia de varredura nos tempos de 1, 3 e 7 dias, realizando um estudo de atividade antioxidante, uma vez que os mecanismos antioxidantes são essenciais para propriedade neuroprotetora. Os *scaffolds* de fibroína de seda pura mostraram pouca ou nenhuma atividade antioxidante quando comparadas com os associados a melanina. Observou-se o excelente molhamento e propriedades hidrofóbicas que suportam a adesão celular ideal.

Também analisando a capacidade do material na engenharia de tecido nervoso, Tang-Schomer et al. (2018) (39), verificaram por meio de cultura celular de neurônios primários a atuação de matrizes (ou *scaffolds*) baseadas em fibroína de seda com ou sem colágeno. Em uma tentativa de regenerar neurônios *in vitro*, simulando um cérebro primário, eles analisaram parâmetros de alteração de fenótipo celular, em técnicas 2D e 3D, por meio de imunocoloração e citometria de fluxo. Segundo os pesquisadores, a base feita de fibroína de seda tem características inertes que não reage com os neurônios, sua estrutura porosa permite produzir um microambiente genuíno, permitindo agrupamento neuronal e conexões axonais de longa distância. Apontaram como desafio do estudo, a estipulação dos tempos de análises das amostras, uma vez que o número de variáveis a serem testadas era muito grande para uma quantidade finita de células.

Visto sua aplicação em tecido ósseo e pele e a fim de verificar a viabilidade do uso de fibroína de seda na engenharia de tecido nervoso, Yang et al. (2007) (40) cultivaram células nervosas periféricas, mais especificamente, gânglios da raiz dorsal de ratos, sob um substrato de fibroína. Foram cultivadas 24 placas em meio de soro fetal bovino, incubados a 37 °C numa atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> e células de *Schwann* de ratos *Sprague-Dawley* neonatais extirpadas sob condição estéril. O crescimento celular foi observado por microscópio (Olympus IX-70, Japão). Logo após realizada a imunohistoquímica, amostras foram observadas sob um microscópio de varredura a laser (TCS SP2, *Leica Microsystems*, Alemanha). O grupo controle era formado por células cultivadas em meio ao extrato de hidroxiapatita. A imunocitoquímica indicou células de *Schwann* ligadas e circundando as fibras de fibroína, elas tinham a estrutura interna completa e aparência normal. Após 12 horas de cultura, a viabilidade das células cultivadas em fibroína foi maior, mas não significativa. Após 24, 48 e 72 horas, essa diferença tornou-se estatisticamente significante. Os níveis de RNA mensageiro (importante marcador para células de *Schwann*) também não obtiveram diferenças quando comparado ao controle.

Coletivamente, os dados expressam que a fibroína tem boa compatibilidade sem exercer efeito citotóxico sobre o fenótipo ou função das células em estudo.

Também analisando a capacidade do material na engenharia de tecido nervoso, Tang-Schomer et al. (2018) (39), verificaram por meio de cultura celular de neurônios primários a atuação de matrizes (ou *scaffolds*) baseadas em fibroína de seda com ou sem colágeno. Em uma tentativa de regenerar neurônios *in vitro*, simulando um cérebro primário, eles analisaram parâmetros de alteração de fenótipo celular, em técnicas 2D e 3D, por meio de imunocoloração e citometria de fluxo. Segundo os pesquisadores, a base feita de fibroína de seda tem características inertes que não reage com os neurônios, sua estrutura porosa permite produzir um microambiente genuíno, permitindo agrupamento neuronal e conexões axonais de longa distância. Apontaram como desafio do estudo, a estipulação dos tempos de análises das amostras, uma vez que o número de variáveis a serem testadas era muito grande para uma quantidade finita de células.

#### **b. *In vivo***

O reparo de grandes lesões em nervos periféricos tem como tratamento padrão ouro o auto enxerto, pois fornece o tubo da membrana basal necessário para o crescimento de axônios, sem que haja rejeição do organismo. Entretanto, como a área doadora nem sempre é suficiente, corre-se o risco de perda da função motora. Na busca por um enxerto que superasse (em excelência) o auto enxerto para grandes defeitos nervosos, Rao et al. (2019) (41), em estudo inédito, desenvolveram uma esponja de fibroína de seda e ácido poli-láctico 3D (composta por nanofibras de diâmetro controlado, grande área e alta porosidade) que reproduziu (com fidelidade) *in vivo* a estrutura hierárquica da matriz extracelular (com conduto de orientação oco). Esta característica representa um dos desafios na produção do *scaffold* ideal, pois não restringe a proliferação e infiltração celular, condição não alcançada quando da técnica de eletrofição (comumente usada na engenharia de tecidos, em que se produz nanofibras 2D).

Os autores inseriram *scaffolds* semeados com células de Schwann em defeitos de 10 mm entre os cotos nervosos, produzidos no nervo isquiático de rato (Grupo NGC), comparando com *scaffold* sem a base do conduto de orientação do nervo oco (Grupo SNGC) e auto enxerto (grupo controle). Nas 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao sistema de análise de marcha, para detectar recuperação da função motora, com base no registro de caminhadas. Após 12 semanas de experimento, os ratos foram anestesiados e o músculo

gastrocnêmico e o nervo isquiático foram expostos para avaliação eletrofisiológica. O sistema eletrofisiológico Medlec Synergy (Oxford Instrument Inc., Abingdon, Reino Unido) foi usado para verificar atividade elétrica em todos os grupos, estimulando clinicamente os nervos.

Para avaliar a regeneração nervosa, o enxerto de nervo de todos os grupos foi coletado, corados com solução de azul de toluidina e observados em microscopia ótica. O software Image Pro Plus foi usado para calcular o diâmetro da fibra nervosa e a espessura da bainha de mielina. Ao mesmo tempo, os músculos gastrocnêmicos do lado operado e do oposto foram coletados e submetidos a coloração de tricrômico de Masson. Para cada amostra, fotos foram tiradas de três campos aleatórios e analisadas quantitativamente com o software Image Pro Plus. No sistema de análise de marcha o grupo SNGC mostrou percentual semelhante ao controle, e significativamente maior que o NGC. Os dados eletrofisiológicos mostraram uma maior amplitude de movimento no grupo SNGC. No histológico, os músculos gastrocnêmicos operados e contralaterais mostraram graus de atrofia em todos os grupos. O grupo SNGC foi semelhante ao controle, ambos melhores que NGC. Quanto ao efeito regenerativo, o grupo controle mostrou os melhores resultados, e o grupo SGNC foi estatisticamente melhor que o NGC. Com base nestes resultados, os autores consideraram esse material tem boas perspectivas de aplicação em reparo de nervo periférico.

Ainda, Kang et al. (2018) (42) usaram um preparado hidrolisado enzimático de fibroína de seda (FPEH), vendido sob o nome comercial de Cera-Q (Novel Ingredients LLC, East Hanover, NJ, EUA), para melhorar a função cognitiva em seres humanos. O material de estudo foi aprovado pelo Ministério Coreano da Segurança Alimentar e Fármaco como um ingrediente alimentar sem limites na quantidade de ingestão. Um total de 76 indivíduos, de até 96 anos, foi recrutado para o estudo e foram randomizados em 4 grupos. O estudo foi controlado por placebo, randomizado e duplo-cego. Eles consumiram oralmente o placebo, ou 280, 400 ou 600 mg do preparado purificado. Todos os indivíduos completaram o Teste de Memória de Rey-Kim no início e após a conclusão de três semanas do tratamento. Os aspectos verbal e de figura da memória foram testados.

Os resultados indicaram uma melhoria da função cognitiva. Os autores evidenciam que o FPEH contém nutrientes que aumentam a captação de glicose e aumento do fluxo sanguíneo cerebral. Pequenos peptídeos de 5 a 11 aminoácidos de comprimento presentes no FPEH são chamados de *beta-sheet breakers* e se ligam a *beta-amyloid* bloqueando a capacidade de iniciar a cascata de formação de fibrilas. Esses peptídeos colaboram para prevenção de danos deletérios iniciais.

Assim como Cai et al. (2002) (13), Wei et al. (2011) (43) associaram a fibroína com poli (ácido L-láctico-cocaprolactona) – uma quitosana, porém, o composto desta vez foi utilizado para cirurgia de regeneração de nervo em ratos adultos Sprague-Dawley. Células de Schwann foram cultivadas em meio de soro fetal bovino e semeadas em *scaffold* de fibroína. Depois de verificada a viabilidade das células, os nervos isquiáticos de 32 ratos foram lesados cirurgicamente, e então reconstruídos com enxerto do *scaffold* carregado de células. Ratos não enxertados representaram o controle negativo.

Depois da cirurgia, os animais foram monitorados para mudança de aparência, movimentos de membro posterior e cicatrização da ferida cirúrgica. 12 e 24 semanas após a intervenção foi avaliada a recuperação funcional do nervo, por meio de caminhada em pista específica. Então, os enxertos do nervo e o músculo gastrocnêmico foram colhidos para análise histológica e imuno-histoquímica. Após a décima segunda semana de transplante, o grupo experimental da fibroína melhorou a função do nervo, indicando que axônios regenerados haviam penetrado pelo enxerto e para o órgão alvo.

A análise estatística revelou que a recuperação dos animais enxertados com fibroína foi muito maior que o controle. A análise histológica, por sua vez, mostrou que o *scaffold* aumenta muito o processo de regeneração do nervo isquiático. Na imuno-histoquímica, numerosos axônios foram vistos. Os resultados mostram recuperação funcional, restauração da continuidade nervosa reinervação extensa do músculo alvo.

Wang et al. (2011) (44) utilizaram-se do mesmo *scaffold* nanofibroso descrito acima. Sua morfologia foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde observaram estruturas perfeitamente alinhadas, superfície sólida com vazios interligados. Três grupos de 12 animais foram formados: controle positivo (autoenxerto), experimental (enxerto de *scaffold* de fibroína) e controle negativo, sendo que trinta e seis ratos tiveram uma porção de seus nervos isquiático removidos cirurgicamente. As reações fisiológicas foram avaliadas em quatro e oito semanas após o procedimento. Desta vez, esta análise foi feita por meio de eletrodos bipolares e eletrodo de registro monopolar.

Na análise histológica foi usado azul de toluidina e imunohistologia. Com relação a análise dos nervos, o grupo formado por fibroína apresentou nervos mais “organizados” em comparação com autoenxerto. Na quarta semana, foi feita a contagem total de fibras mielinizadas dos nervos regenerados e o grupo fibroína continha um número significativamente maior que o controle negativo, embora significativamente menor que o controle positivo. Já na oitava semana, observou-se que o grupo teste era significativamente maior que ambos os

controles. Na imunohistoquímica, ele mostrou níveis aumentados de marcador das células de *Schwann*. Os autores mencionaram que as fibras do enxerto se mantiveram sem biodegradação durante as oito semanas. Mais estudos devem ser realizados para esclarecer seu tempo de degradação, pois outra cirurgia para removê-lo deve ser evitada. Visto isso, crê-se que o *scaffold* de fibroína pode ser útil na regeneração de nervos, mesmo em defeitos críticos.

#### **4.4 Capacidade hemostática**

##### **a. *In vivo***

O curso clínico do aneurisma é caracterizado pela ameaça à vida, já que sua parede é extremamente frágil e dificulta extração cirúrgica. Causin et al. (2011) (45) fizeram um estudo de caso clínico com fibroína para desvio de fluxo de aneurisma. Dois pacientes do sexo masculino e uma paciente do sexo feminino, com idades entre 42 e 56 anos, com hemorragia subaracnóidea causada por pequenos aneurismas, foram submetidos a pesquisa onde instalaram desviadores de fluxo de seda (Balt Extrusion, Montmorency, França) pela técnica stentwithin-a-stent. Este é um dispositivo retrátil projetado para alcançar reconstrução da artéria parental associada com um aneurisma intracraniano. Os dispositivos foram implantados no sifão carotídeo dos pacientes. A principal vantagem do uso deste dispositivo é a capacidade de selar o aneurisma com preservação do fluxo carotídeo. Foi realizada terapia antiplaquetária para evitar a formação de trombos. Todos os pacientes foram tratados dentro de 48 horas, na fase aguda da lesão, e vários dispositivos para cobri-las completamente foram colocados. Todos os aneurismas foram bloqueados com sucesso, e os pesquisadores acreditam que desviador à base de fibroína impediram que as lesões voltassem a sangrar. Angiografias foram realizadas para acompanhamento dos pacientes.

Usando o mesmo dispositivo descrito acima, Leonardi et al. (2011) (46) trataram 25 pacientes com idades entre 34 a 81 anos. Eles passaram pelo protocolo de medicação antiplaquetária e também tiveram o acompanhamento feito por angiografia. A colocação do *stent* foi bem-sucedida em todos os indivíduos. O fechamento do aneurisma não foi alcançado em três pacientes, porém, os pesquisadores atribuem o insucesso ao tempo decorrido desde a formação da lesão inicial (cerca de 12 meses). Ocorreram dois casos de óbitos registrados como ruptura espontânea do *stent* e hemorragia devido ao uso de coagulante. Os autores consideraram o *stent* de fibroína de seda uma ferramenta valiosa no tratamento endovascular de aneurismas.

Shefa et al. (2019) (47) projetaram um estudo para investigar o efeito da trombina (Th) no desempenho hemostático de produtos de nanofibra de celulose oxidadas (TOCN). *Scaffolds* de TOCN e fibroína de seda em duas concentrações (2% e 5%) foram criados. Solução de trombina de plasma bovino foi adicionada em grupos experimentais. Cinco grupos foram formados: 1) TOCN TEMPO (nanofibra de celulose oxidada), 2) TOCN SF2 (TOCN E 2% de fibroína de seda), 3) TOCN SF5 (TOCN e 5% de fibroína de seda), 4) TOCN SF2 Th (TOCN, 2% de fibroína de seda mais trombina) e 5) TOCN SF5 Th (TOCN, 5% de fibroína de seda com trombina). A capacidade de absorção de sangue foi analisada *in vitro*, onde os *scaffolds* esponjosos foram aplicados sobre a superfície de sangue, coletado de coelhos brancos, por 20 segundos. O peso dos *scaffolds* foi medido com uma microescala (Ohaus Pioneer, USA) antes do contato com o sangue e depois. Então, fibroblastos L929 de camundongo foram cultivados e semeados nos *scaffolds* e foram visualizados sob um microscópio fluorescente (Olympus, FV10i-W, Tóquio, Japão), sendo as imagens analisadas usando o software FV10i-ASW 2.0 Viewer. Estas amostras foram utilizadas para três experimentos *in vivo*. No primeiro, uma lesão da artéria auricular de coelhos foi criada e, após dez segundos de sangramento, as amostras foram colocadas na ferida e calcularam o peso médio dos *scaffolds* e o tempo hemostático médio. No segundo, amputaram oito cm das caudas de ratos, deixando sangrar por 15 segundos, e cobriram as feridas com as amostras. Os mesmos parâmetros foram calculados. Por fim, fizeram a avulsão do fígado de ratos e aplicaram no local as amostras e também o padrão comercial Hemostat Floseal. Após 30 minutos da aplicação, a interação das células do sangue com hemostatos foi visualizada por MEV. A maior capacidade de absorção foi desempenhada pelo *scaffold* de fibroína a 5%.

A morfologia das células confirmou a capacidade de formação de trombos dos *scaffolds*; além disso, eles foram capazes de manter o ambiente úmido, o que favorece a cicatrização. Os *scaffolds* que continham fibroína de seda tiveram grande crescimento de fibroblastos viáveis e as células não foram prejudicadas pelo carregamento com trombina. A capacidade de aumentar os níveis de agregação plaquetária foi confirmada pela MEV, exibindo formação de pseudópodes em todos os grupos. Contudo, baixos números de plaquetas foram observados nos *scaffolds* sem fibroína de seda, e quanto maior a concentração da proteína, maior a agregação das plaquetas. No mais, os *scaffolds* carregados de trombina apresentaram o maior número de plaquetas, sugerindo que os *scaffolds* sintetizados facilitam a aderência e ativação.

Quanto aos modelos *in vivo*, a experiência realizada na artéria auricular dos coelhos trouxe que a amostra contendo fibroína a 5% absorveu a maior quantidade de sangue e também teve o sangramento interrompido no menor tempo possível, enquanto que a amostra que continha apenas o TOCN teve mais tempo de hemorragia entre todos os grupos pesquisados. Nos modelos de amputação de cauda de ratos e avulsão de fígado, as amostras de fibroína a 2% e 5% obtiveram diminuições significativas da perda de sangue quando comparadas ao Floseal, sem diferenças significativas entre si. A modificação do TOCN com fibroína e o carregamento com trombina mostraram desempenho hemostático reforçado.

#### **4.5 Regeneração pulpar**

##### **a. *In vivo***

Yang et al. (2015) (48) avaliaram a possibilidade de utilizar fibroína de seda para regeneração da polpa com células tronco da polpa dental (DPSCs) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) em modelo de transplante de canal ectópico. Porções radiculares de dentes humanos extraídos recentemente foram seccionadas em 3mm de comprimento. O espaço do canal foi ampliado. Os fragmentos (*tooth fragments/scaffolds* - TSS) foram tratados em banho de ultrassom para expor os tubos dentinários, seguido de tratamento com betadine e NaClO para esterilização. Quatro grupos foram formados: 1) fragmentos de dentes vazios (controle negativo), 2) TSS/SF (*scaffold* de fibroína pura – controle positivo), 3) TSS/SF/DPSCs (*scaffold* de fibroína e células tronco da polpa), 4) TSS/SF/DPSCs/bFGF (*scaffold* de fibroína, fator básico de crescimento de fibroblastos e células tronco da polpa). Os *scaffolds* foram inseridos no espaço do canal radicular dos fragmentos. Então, foram implantados no espaço subcutâneo de ratos. Sete semanas após o transplante, os animais foram sacrificados e análises histológicas e imunológicas foram realizadas. Quanto à caracterização das células-tronco, apresentaram crescimento semelhante a fibroblastos e formação de colônias derivadas, que poderiam ser transformadas em osteoblastos, odontoblastos, adipócitos ou neurócitos. A presença do bFGF promoveu maior deposição de matriz extracelular e viabilidade celular. No modelo TSS/SF/DPSCs, a área referente ao espaço do canal radicular foi preenchida por tecido conjuntivo vascularizado. Já para os *scaffolds* TSS/SF/DPSCs/bFGF observou-se a formação de um tecido com características morfológicas semelhantes a um dente normal: tecido mineralizado depositado ao longo da estrutura interna, tecido conjuntivo semelhante a polpa

(bem vascularizado), deposição de matriz de colágeno e dentina (na análise imunohistoquímica). Esse resultado pode indicar formação de células semelhantes a odontoblastos.

## 5 Discussão

Preservar a vitalidade da polpa é a base da Odontologia clínica: a regeneração em oposição a reparação propõe reduzir intervenções e manter as funções de nutrição, defesa e propriocepção. Há evidências de que a fibroína é um *scaffold* seguro e eficiente, tendo propriedades mecânicas e biológicas que sustentam a teoria de que pode ser usada na regeneração pulpar. Entre elas: excelente barreira bacteriana, acelera a reepitelização e por isso promove cicatrização de feridas, reparação e regeneração de pele, e permite inclusão e tramitação de fluidos. Seu uso foi testado em fibroblastos, osteoblastos e células nervosas. Outros biomateriais estudados para este fim, como alginato e colágeno, não reúnem essas características peculiares compatíveis com o ambiente da polpa.

A engenharia tecidual tem sido investigada na Odontologia em outras áreas estomatognáticas. A exemplo, destaca-se o uso de colágeno como *scaffold* para regeneração óssea. Seu uso como material para implantes é limitado, devido às suas características mecânicas maleáveis. O colágeno pode promover um ambiente propício para o crescimento de células, mas só pode ser desenvolvido como filme ou esponja. Existem poucos métodos de fabricação de filmes porosos. Em contraste, as sedas são adaptáveis e têm lenta degradação, podendo ser fabricadas em forma porosa, o que permite a remodelação de tecidos mineralizados (49,50-52,58).

A taxa de reabsorção do material é outro ponto a ser observado. Ela é desejada e, idealmente, deve refletir a taxa de degradação do tecido no qual está trabalhando (35). Por exemplo, a taxa de reabsorção para regeneração óssea deve ser lenta, já para reparos epidérmicos requerem uma degradação mais rápida. A reabsorção dos biomateriais da seda depende das características morfológicas, origem dos *Bombyx mori* e também da metodologia de processamento da proteína. Diferentes estudos mostram diferentes mudanças estruturais no processo de degradação (14,53). Fato esse que torna a previsibilidade do material muito vaga em referência a esse aspecto. Mais estudos são necessários para elucidar o tema.

As pesquisas revisadas sobre o uso de *scaffolds* de fibroína de seda, associada ou não a outro material biocompatível, e seu comportamento sobre fibroblastos (34-37) (Chiarini *et al.* 2003) (12) evidenciam que o material pode ter um bom comportamento em ambiente pulpar, já que estas são as células encontradas em maior volume na polpa. Muitos deles, ainda indiferenciados, tornando seu uso favorável à engenharia de tecidos (7). Os estudos mostram grande biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, crescimento, proliferação e manutenção

celular adequados, além de características mecânicas ideais, como: excelente molhamento, porosidade e resistência à tração.

As células nervosas tornam a polpa um tecido especializado. Sua inervação inclui um grande número de axônios mielinizados e não mielinizados (7). É um requisito essencial que um material inserido nesse ambiente não seja citotóxico às fibras nervosas, do contrário, permita sua proliferação e crescimento para que se estabeleça um novo tecido saudável, sem perder sua capacidade sensorial. Nesta revisão, os artigos mencionados (13,38,39,41,42,44,48) trazem dados importantes de recuperação funcional, crescimento de células nervosas sem alteração de fenótipo e regeneração de defeitos largos em tecidos tratados com *scaffolds* de fibroína.

Ademais, o tecido da polpa é circundado por dentina, cemento e osso, portanto a interação de um material aplicado para regeneração pulpar deve ser avaliada na presença dos elementos encontrados nesses tecidos. Os estudos aqui citados (11,13,29-31,33,54) relacionaram os *scaffolds* de fibroína de seda com células induzidas osteogenicamente, e encontraram células viáveis, comportamento mecânico condizente e biodegradação lenta. Inclusive, a pesquisa de Zhao et al. (2009) (31) foi realizada em mandíbula e apresentou bons resultados.

O uso de células-tronco da polpa dental de humanos pode ter sua eficácia testada quando relacionada a *scaffolds* de fibroína, como mostram os estudos de Riccio et al. (2012) (32) e Woloszyk et al. (2014) (28), que revelaram que a biocompatibilidade e sucesso da fibroína é ressaltada quando associada a esse tipo específico de célula. Entretanto, os estudos não tinham por objetivo mimetizar o ambiente pulpar, e sim a cura de defeitos ósseos. A evidência de Yang et al. (2015) (48) é um dos poucos estudos que relaciona a fibroína como *scaffold* com o intuito de regenerar a polpa.

Os odontoblastos são as células responsáveis pela dentinogênese (7), e tem importante papel no tratamento de exposição pulpar, já que compete a eles a formação da barreira dentinária, aspecto que garante sucesso à terapêutica. Esta pesquisa esclarece que a fibroína pode efetivamente levar à regeneração da polpa com tecido semelhante à dentina sendo depositado ao longo da parede dentinária. Os pesquisadores destacam que o sucesso do biomaterial se deve ao tamanho do poro do *scaffold*, que favorece a difusão de nutrientes e remoção de substâncias, além de fornecer um microambiente tridimensional indutor de diferenciação celular. O fator de crescimento de fibroblastos foi escolhido para promover a

formação vascular, bem como a deposição de dentina. Entretanto, o carregamento dos *scaffolds* com células torna as condições de fabricação desafiadoras.

Por fim, uma vez que a polpa está confinada por tecidos duros, limita-se a aceitação para vasodilatação. Mesmo estando apoiada por um sistema microcirculatório colateral não verdadeiro, qualquer alteração de fluxo pode levar a danos severos, como a necrose (7). Os dispositivos apontados nos estudos de Leonardi et al. (2011) (46) e Causin et al. (2011) (45) mostram que mesmo quando associada a áreas de irrigação sanguínea elevada, a fibroína de seda não causa hemorragia. Mostra um potente efeito hemostático, sendo utilizada como *stent* para tratamento de aneurismas.

Em síntese, Trongkij et al. (2019) (55) trazem em seu estudo algumas características do material capeador pulpar ideal, que serão listadas na tabela abaixo. Ao lado, estarão referenciados trabalhos que comprovam estas particularidades na fibroína de seda.

Tabela 1-Referências utilizadas na avaliação das propriedades da fibroína e do capeador pulpar ideal

<b>CAPEADOR PULPAR IDEAL</b>	<b>FIBROÍNA DE SEDA</b>
Biocompatibilidade	Miguel et al. (2019); Riccio et al. (2012); Woloszyk et al. (2014); Chiarini et al. (2003); Carvalho et al. (2016); Vázquez et al. (2017); Arias et al. (2018) <sup>(32,36,28,12,34,37,35)</sup> .
Indução da formação de tecidos duros	Woloszyk et al. (2014); Meinel et al. (2006); Lee et al. (2018) <sup>(28,29,11)</sup> .
Reação inflamatória mínima ou ausente	Vázquez et al. (2017); Jo et al. (2017) <sup>(37,33)</sup> .
Promover proliferação de células	Chiarini et al. 2003; Cai et al. 2002; Kundu et al. 2013, Kundu et al. 2008 <sup>(12,13,14,15)</sup> .
Alta alcalinidade	Woloszyk et al. (2014) <sup>(28)</sup> .
Cicatrização tecidual	Miguel et al. (2019); Wei et al. (2011); Shefa et al. (2019); Mostow et al. (2005); Quin, (2005); Wenk et al. (2011); Fernandes e Silva et al. (2015); Zhang et al. (2017) <sup>(36,43,47,49,50,51,52,58)</sup> .
Barreira mecânica	Yang et al. (2015) <sup>(48)</sup> .

Portanto, estes dados em geral apontam o futuro da fibroína de seda na Odontologia e no ambiente da polpa. Há necessidade de estudos *in vivo* ou *in vitro* direcionados aos efeitos da proteína no complexo dentina-polpa, que efetivem o material como potencial regenerador pulpar para uso em capeamento pulpar.

## 6 Conclusão

Por ser um material biocompatível, a fibroína de seda é de grande interesse para engenharia de tecidos. *Scaffolds* de fibroína criam um ambiente favorável para o crescimento de várias células encontradas na polpa, como por exemplo fibroblastos e osteoblastos, além de comprovadamente propiciar o crescimento de células nervosas e ter bom comportamento hemostático. Esses indicadores nos mostram que este material tem potencial regenerador pulpar e pode caracterizar uma interessante opção aos materiais encontrados no mercado para o procedimento de capeamento pulpar.

## 7 Referências bibliográficas

1. Sinhoreti MAC, Vitti RP, Sobrinho LC. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev reg Aracatuba assoc paul cir dent* 2013; 67:178-86.
2. Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering. Science. New Series*, 1993; 260:920-926.
3. Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol 2000* 2006; 41:177-187.
4. Duailibi SE, Duailibi MT, Zang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered Dental Tissues Grown in the Rat Jaw. *J Dent Res* 2008; 87:745-750.
5. Briso ALF, Rahal V, Mestreneur SR, Junior ED. Resposta biológica de polpas submetidas a diferentes materiais capeadores. *Braz Oral res* 2008; 20:167-172.
6. Casarin D, Calza JV, Da silva SBA, Da silva VA. Uso da proteção do complexo dentino-pulpar por discentes de odontologia. *J Oral Invest* 2016; 5:40-49.
7. Hargreaves KM, Berman LH. *Caminhos da polpa. 11ª Edição*, Elsevier; 2017.
8. Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentine bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent* 1996; 21:4-11.
9. Nair PNR, Duncan HF, Pitt ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2008; 41:128-50.
10. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan, DL. Silk based biomaterials. *Biomaterials* 2003; 24:401-416.
11. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, Merkle HP. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* 2006; 39:922-931.
12. Chiarini A, Petrini P, Bozinni S, Dal pra I, Armato U. Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: *in vitro* interactions with h human cells. *Biomaterials* 2003; 24:789-799.
13. Cai K, Yao K, Lin S, Yang Z, Li X, Xie H, Qing H, Gao L. Poly(d,l-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast *in vitro*. *Biomaterials* 2002; 23:1153-1160.
14. Kundu B, Rajkhwoa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65:457-470.
15. Kundu SC, Dash BC, Dash R, Kaplan DL. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Prog Polym Sci* 2008; 33:998-1012.

16. Brancalhão RMC, Torquato EFB, Soares MAM, Bilha JK. Bicho da Seda: montagem do ciclo de vida. *Arq Apadec* 2004; 8:58-60.
17. Hartmann, G.C, Brandão, C.G, Rangel A.L.C.A. **Avaliação histológica do capeamento pulpar direto com sericina de seda em ratos: um estudo preliminar**. 2018. 40f. Dissertação de (Mestrado em odontologia) – Centro de ciência biológicas e da saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.
18. Olsburgh S & Krejci I. Pulp response to traumatic crown fractures. *Endod Topics* 2003; 5:26-40.
19. Gesi A, Bergenholtz G. Pulpectomy – studies on outcome. *Endod Topics* 2003; 5:57-70.
20. Azimi S, Fazlyab M, Sadri D, Saghiri MA, Khosrayanifard B, Asgary S. Comparison of pulp response to mineral trioxide aggregate and a bioceramic paste in partial pulpotomy of sound human premolars: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2014; 47:873-881.
21. Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-karim I, Kundzina R, Krastl G, Dammaschke T, Frasson H, Markvart M, Zehnder M, Bjorndal L. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J* 2019; 52:923-934.
22. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin/pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2019; 13:58-75.
23. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/Progenitor Cell-Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an *In Vivo* Model. *Tissue Eng Part A* 2010; 16:605-615.
24. Kasoju N & Bora U. Silk Fibroin in Tissue Engineering. *Adv. Healthcare Mate* 2012; 4:393-412.
25. Mori H, Tsukuda M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *Mol Biotechnol* 2000; 74:95-103.
26. Montanha, V.C, Yoshiokua, S.A. **Caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco**. 2012. 87f Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
27. Ma PX, Zhang R. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *Fibrillar Matrices*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52:430-8. US Patent 6,146, 892, 2000.
28. Woloszyk A, Dirksen SH, Bostanci N, Müller R, Hofmann S, Mitsiadis TA. Influence of the Mechanical Environment on the Engineering of Mineralised Tissues Using Human Dental Pulp Stem Cells and Silk Fibroin Scaffolds. *PLOS One* 2014; 9:10.
29. Lee H, Yang GH, Kim M, Lee J, Kim G. Fabrication of micro/nanoporous collagen/dECM/silk-fibroin biocomposite scaffolds using a low temperature 3D printing process for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng* 2018; 84:140-147.

30. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Kaplan D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005; 37:688-698.
31. Zhao J, Zhang Z, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, Jiang X. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 2009; 45:517-527.
32. Riccio M, Maraldi T, Pisciotta A, La sala GB, Ferrari A, Bruzzesi G, Motta A, Migliaresi C, De Pol A. Fibroin Scaffold Repairs Critical-Size Bone Defects *In Vivo* Supported by Human Amniotic Fluid and Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Eng* 2012; 18:9-10.
33. Jo YY, Kim SG, Kwon KJ, Kweon H, Chae WS, Yang WG, Lee EY, Seok H. Silk Fibroin-Alginate-Hydroxyapatite Composite Particles in Bone Tissue Engineering Applications *In Vivo*. *Int J Mol Sci* 2017; 18:858.
34. Carvalho GC, Lopes RJ, Tavares DS, Almeida LE. Avaliação de arcabouços tridimensionais de alginato, fibroína e hidroxiapatita para regeneração tecidual óssea. In: 9º Congresso latino-americano de Órgãos Artificiais e biomateriais, Foz do Iguaçu, Brasil, 2016.
35. Arias DG, Agudelo AG, López EC. Evaluación del crecimiento de fibroblastos humanos en andamios de fibroína de Bombyx mori L. *Rev Colomb Biotecnol* 2018; XX:47-56.
36. Miguel SP, Simões D, Moreira FD, Sequeira RS, Correia IJ. Production and characterization of electrospun silk Fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications". *Int J Biol Macromol* 2019; 121:524-535.
37. Vázquez N, Rodríguez-barrientos CA, Aznar-cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC, Sánchez-Avila RM, Persinal M, Brea-pastor A, Fernández-veja-cueto L, Meana Á, Merayo-lloves J. Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58:33-58.
38. Nune M, Manchineella S, Govindaraju T, Narayan KS. Melanin incorporated electroactive and antioxidant silk fibroin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Mater Sci Eng* 2019; 94:17-25.
39. Tang-Schomer MD, Wu WB, Kaplan DL, Bookland MJ. In Vitro 3D Regeneration-like Growth of Human Patient Brain Tissue. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12:1247-1260.
40. Yang Y, Chen X, Ding F, Zhang P, Liu J, Gu X. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 2007; 28:1643-1652.
41. Rao F, Yuan Z, Li M, Yu F, Fang X, Jiang B, Wen Y, Zhang P. Expanded 3D nanofibre sponge scaffolds by gasfoaming technique enhance peripheral nerve regeneration. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47:491-500.
42. Kang YK, Lee BY, Bucci LR, Stohs SJ. Effect of a Fibroin Enzymatic Hydrolysate on Memory Improvement: A Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *Nutrients* 2018; 10:233.

43. Wei Y, Gong K, Zheng Z, Wang A, Ao Q, Gong Y, Zhang W. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. *J Mater Sci: Mater Med* 2011; 22:1947-1964.
44. Wang CY, Zhang HK, Fan CY, Mo XM, Ruan HJ, Li FF. Aligned natural– synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater* 2011; 7:634-643.
45. Causin F, Pascarella R, Pavesi G, Marasco R, Zambon G, Battaglia R, Munari M. Acute Endovascular treatment (<48 hours) of uncoilable ruptured aneurysms at non-branching sites using silk flow-diverting devices. *Interv Neuroradiol* 2011; 17:357-64.
46. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, Dall'olio M, Princiotta C, Stafa A, Simonetti L, Agati R. Treatment of Intracranial Aneurysms using flow-diverting Silk Stents (BALt): a Single Centre Experience. *Interv Neuroradiol* 2011; 17:306-315.
47. Shefa AA, Taz M, Lee SY, Lee BT. Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading. *Carbohydr Polym* 2019; 208:168-179.
48. Yang J, Zhang Y, Sun Z, Song G, Chen Z. Dental pulp tissue engineering with bFGF-incorporated silk fibroin scaffolds. *J Biomater Appl* 2015; 30:221-229.
49. Mostow EN, Haraway GD, Dalsing M, Hodde JP, King D. Oasis Venus Ulcer Study Group. Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. *J Vasc Surg* 2005; 41:837-43.
50. Quin Y. The characterization of alginate wound dressings with different fiber and textile structures. *J Appl Polym Sci* 2006; 100:2516.
51. Fernandes & Silva E, Macagnan KL, Ferrúa CP, Severo FR, Demarco FF, Nedel F. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em Odontologia. *RFO* 2015; 20:372-379.
52. Zhang W, Chen L, Chen J, Wang L, Gui X, Ran J, Xu G, Zhao H, Zeng M, Ji J, Qian L, Zhou J, Ouyang H, Zou X. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv. Healthcare Mater* 2017;6:1700121(1 to 16).
53. Lu Q, Zhang B, Li M, Zuo B, Kaplan DL, Huang Y, Zhu H. Degradation Mechanism and Control of Silk Fibroin. *Biomacromolecules* 2011; 12:1080-1086.
54. Xiao H, Huang W, Xiong K, Ruan S, Yuan C, Mo G, Tian R, Zhou S, She R, Ye P, Liu B, Deng J. Osteochondral repair using scaffolds with gradient pore sizes constructed with silk fibroin, chitosan, and nano-hydroxyapatite. *Int J Nanomedicine* 2019; 14: 2011-2027.
55. Trongkij P, Sutimuntanakul S, Laphthanasupkul P, Chaimanakarn C, Wong HR, Banomyong D. Pulpal responses after direct pulp capping with two calcium-silicate cements in a rat model. *Dent Mater J* 2019; 38:584-590.
56. BNDS - Banco Nacional do Desenvolvimento. Seda um Tecido Nobre.

57. Brancalhão RMCA, Torquato EFB, Ribeiro LFC, Baggio MPD, Paiva CR. Interdisciplinariedade e o ensino do bicho-da-seda, no contexto da educação ambiental. In: I Colóquio Internacional da rede de pesquisa em Educação Ambiental por Bacia Hidrográfica, Cascavel, Brasil, 2013.

58. Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J Control Release* 2011; 150:128-141.