

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Breno Marques Ferreira

Protocolos de descelarização da polpa dentária

Juiz de Fora

2023

Breno Marques Ferreira

Protocolos de descelularização da polpa dentária

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Breno Marques.

Protocolos de descelularização da polpa dentária / Breno Marques Ferreira. -- 2023.

41 p.

Orientador: Antônio Márcio Resende do Carmo

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia, 2023.

1. Descelularização. 2. Polpa Dentária. 3. Endodontia Regenerativa. I. Carmo, Antônio Márcio Resende do, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
REITORIA - FACODONTO - Coordenação do Curso de Odontologia

BRENO MARQUES FERREIRA

Protocolos de descelularização da polpa dentária

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Aprovado em 09 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Marcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Graciele Prado Elias
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Evandro de Toledo Lourenço Júnior
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta monografia primeiramente a Deus por me guiar, aos meus pais e irmãos por me apoiarem e aos meus amigos por dividirem momentos especiais comigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por sempre me proteger e guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Cléverson e Maria José, e aos meus irmãos, Gabriel e Leonardo, agradeço pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por todo carinho e amor.

Agradeço à instituição que abriu as portas para me receber, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, e pôde entregar um excelente ensino e uma grande estrutura, favorecendo na minha formação pessoal e profissional.

Agradeço a todo corpo docente pelos ensinamentos, paciência, respeito e amizade, em especial ao Professor Antônio Márcio Resende do Carmo pelo auxílio e orientação na conclusão deste trabalho.

Agradeço aos demais amigos por todos momentos compartilhados ao longo desse percurso, trazendo alegria e leveza para a vida.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi revisar a literatura acerca dos protocolos de descelularização existentes para obter um *scaffold* através da matriz extracelular (MEC) da polpa dentária. A descelularização consiste em um processo que visa transformar um órgão ou tecido em um arcabouço para receber novas células e iniciar um processo regenerativo. Este pode ser realizado com agentes e/ou métodos usados de forma isolada ou combinada, tendo o propósito de alcançar um *scaffold* com menor número de células, incluindo DNA e células imunológicas, além da preservação de componentes e estruturas essenciais da MEC. Foi realizada uma busca de artigos científicos na base de dados Pubmed, dentro do período de 2008 a 2022, sobre polpa dentária e seus protocolos de descelularização. A literatura revisada possibilitou concluir que há diversos protocolos que utilizam de diferentes agentes e métodos em variadas concentrações e tempo, além de evidenciar suas respectivas eficácias. Mas, destacaram também a ausência de um protocolo padronizado e a necessidade do mesmo, além das dificuldades impostas pela realidade clínica.

Palavras-chave: Descelularização. Endodontia regenerativa. Polpa Dentária. Matriz Extracelular. Tratamento do Canal Radicular.

ABSTRACT

The aim of the present study was to review the literature about the existing decellularization protocols to obtain a scaffold through the extracellular matrix (ECM) of the dental pulp. Decellularization is a process that aims to transform an organ or tissue into a scaffold to receive new cells and initiate a regenerative process. It can be performed with agents and/or methods used alone or in combination, with the aim of achieving a scaffold with a smaller number of cells, including DNA and immune cells, in addition to preserving essential components and structures of the ECM. A search was carried out for scientific articles in the Pubmed database, within the period from 2008 to 2022, on dental pulp and its decellularization protocols. The reviewed literature made it possible to conclude that there are several protocols that use different agents and methods in different concentrations and time, but succeeding in terms of their respective efficiencies. However, they also highlighted the absence of a standardized protocol and the need for it, in addition to the difficulties imposed by the clinical reality.

Keywords: Decellularization. Regenerative Endodontics. Dental Pulp. Extracellular Matrix. Root Canal Therapy.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BMP4	Proteína Morfogenética Óssea 4
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCA	Desoxicolato de Sódio
DFSCs	Células-tronco do Folículo Dentário
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPEM	Matriz extracelular da Polpa Dentária
DPSCs	Células-tronco da Polpa Dentária
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GAG	Glicosaminoglicano
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HDMEC	Células Endoteliais Microvasculares Dérmicas Humanas
hDPSCs	Células-tronco da Polpa Dentária Humana
MEC	Matriz extracelular
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
PAA	Ácido Peracético
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCL	Membrana de Policaprolactona
PDLSCs	Células-tronco do Ligamento Periodontal

PLLA	Ácido Poli-L-Láctico
SCAPs	Células-tronco da Papila Apical
SD	Desoxicolato de Sódio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SHED	Células-tronco de Dentes Decíduos Esfoliados Humanos
SIS	Submucosa do Intestino Delgado Porcino
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TDM	Matriz Dentinária Tratada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	PROPOSIÇÃO	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
4	DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O processo de descelularização consiste na remoção do conteúdo celular, incluindo o ácido desoxirribonucleico (DNA), de um tecido para que este sirva como arcabouço, denominado *scaffold*, para um futuro processo de recelularização (BAKHTIAR et al., 2021). Para a realização de um processo de descelularização, há diversos métodos e agentes que possam ser utilizados. Porém, a escolha de qual deve ser usado torna-se dependente do tecido ou órgão alvo. (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

O uso do processo de descelularização tem sido aplicado previamente na medicina regenerativa para que um órgão sirva de estrutura para o desenvolvimento de um novo órgão (GILBERT, 2012). O crescente uso de métodos alternativos, como a recelularização, está ligado com a relação, cada vez mais negativa, entre o número de doadores e a falência de órgãos e tecidos (GILPIN; YANG, 2017).

Na Odontologia, segundo a literatura revisada, a matriz extracelular (MEC) da polpa dentária tem sido descelularizada para agir como *scaffold* na regeneração pulpar (ALQAHTANI et al., 2018; BAKHTIAR et al., 2021; CHEN et al., 2015; CORDEIRO et al., 2008; HU et al., 2017; KHURSHID et al., 2022; KIM et al., 2021; LEE et al., 2020; MATOUG-ELWERFELLI et al., 2018; PHOTHICHAILERT et al., 2022; SONG et al., 2017; TAN et al., 2021; TRAPHAGENA et al., 2012).

Para a descelularização, independentemente do método e/ou agente escolhido, haverá danos na MEC, mas a escolha correta permite reduzir os efeitos negativos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Como modo de avaliar a eficácia do processo de descelularização, deve-se constar a remoção de componentes celulares e imunogênicos, além da preservação estrutural, física e química da MEC (GILPIN; YANG, 2017).

A má escolha pelo protocolo a ser utilizado pode desencadear diferentes efeitos negativos (KEANE et al., 2012). É essencial que haja uma redução das células imune para impossibilitar que ocorra rejeição às novas células inseridas no processo de recelularização (GILPIN; YANG, 2017; KEANE et al., 2012).

Frente ao crescimento da medicina regenerativa, torna-se o processo de descelularização, seus respectivos protocolos disponíveis e a busca por novos métodos e agentes, como alvo de pesquisas e estudos em busca de meios que apresentem cada vez mais resultados positivos e menos danos. O conhecimento pelo processo de descelularização e, conseqüentemente, de recelularização é cada vez mais necessário pelo Cirurgião-Dentista para poder escolher por métodos alternativos, diante de casos como a regeneração da polpa dentária.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é revisar a literatura em relação aos protocolos de descelularização que possam ser utilizados na polpa dentária com finalidade de transformá-la em *scaffold*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Cordeiro et al. (2008) realizaram um estudo no qual isolaram e cultivaram, em meio de cultura, células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). Foram semeadas em fatias de dentes, utilizadas como *scaffolds*, e posteriormente transplantadas para ratos imunodeficientes com objetivo de avaliar a semelhança do tecido gerado e a polpa dentária. Terceiros molares extraídos foram cortados para obter as fatias de dentes. A câmara pulpar de cada amostra foi preenchida com cloreto de sódio (NaCl) e ácido poli-L-láctico (PLLA) dissolvido em clorofórmio. Após polimerização do PLLA, o cloreto de sódio foi removido com água destilada. Na véspera dos transplantes, os *scaffolds* foram hidrofílicos com incubações em etanol 100%, 90%, 80%, 70%, 5 min cada e depois lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril a 4°C durante a noite. As SHEDs foram semeadas nos *scaffolds* e divididas em 3 grupos diferentes: I) apenas SHED; II) SHED e células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC); III) grupo controle sem células. Os *scaffolds* foram implantados no tecido dorsal de ratos imunodeficientes e extraídos após 14-28 dias. Fixados em formol tamponado 10% e desmineralizado com ácido fórmico 10%, os *scaffolds* foram submetidos à avaliação histológica. Em análise, os autores observaram a formação de um tecido com características morfológicas semelhante à polpa dentária. Foi notado um maior número de células que revestem a pré-dentina nos grupos I e II em relação ao grupo III. O grupo II apresentou maior coloração quanto à presença de células semelhantes a odontoblastos, porém não apresentou aumento significativo de microvasos comparado aos demais grupos. Os autores concluíram que o método apresentado torna-se uma oportunidade na regeneração tecidual de polpas dentárias. Destacaram o uso de SHED e sua capacidade de diferenciar, formar tecido conjuntivo com células de tecidos moles e duros, além de vascularização funcional. Ressaltaram também a diferença existente para a prática clínica que exige o transplante em todo comprimento do canal radicular.

Crapo, Gilbert e Badylak (2011) revisaram a literatura acerca dos processos de descelularização de tecidos e órgãos inteiros, o porquê do uso da MEC como *scaffold* e os cuidados de manter sua estrutura e composição, o sucesso dos protocolos e os objetivos desejados. O uso da MEC descelularizada é relacionado à

sua capacidade de influenciar a mitose, quimiotaxia celular, diferenciação celular direta e indução de remodelação do tecido do hospedeiro. A escolha do agente descelularizador é dependente do tecido ou órgão. Todo agente ou método irá afetar a composição da MEC, porém a escolha certa resultará em menores danos. Agentes químicos, como ácidos e bases, são responsáveis por causar ou catalisar a degradação hidrolítica das biomoléculas. O ácido peracético é o mais comumente usado, causando remoção de resíduos nucleicos e afetando minimamente a composição e estrutura da MEC. Soluções hipotônicas são utilizadas para causar lise celular e soluções salinas hipertônicas para lavagem de resíduo celular, tratamento das amostras e dissociação do DNA das proteínas. Os detergentes iônicos, como SDS, zwitteriônicos, como CHAPS, e não-iônicos, como TritonX-100, causam solubilização da membrana celular e dissociação do DNA das proteínas, o que pode afetar as proteínas da MEC. O TritonX-100 é efetivo para remover resíduos celulares em tecidos mais espessos. O SDS é mais eficaz quando comparado ao TritonX-100 para remover núcleos, porém pode alterar a estrutura e eliminar fatores de crescimento da MEC. Álcoois, como o glicerol, causam desidratação e lise celular, auxiliando na descelularização. Acetona também pode ser utilizada para remover lipídios durante o processo.

Os autores completam ainda que enzimas como nucleases, lipases, collagenases são utilizadas, porém com baixa capacidade de remover totalmente as células quando usadas sozinhas. Agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), são utilizados para dissociar células das proteínas da MEC, mas são incapazes de remover células superficiais, sendo necessário a combinação com enzimas e/ou detergentes. O processamento por congelamento-descongelamento é utilizado para lise celular, porém deve ser associado a outro processamento. Abrasão mecânica combinada com enzimas, solução hipertônica ou agente quelantes, podem remover células superficiais através da força e pressão, porém podem danificar a estrutura da MEC. A escolha pelo agente de descelularização é dependente das características individuais do tecido ou órgão alvo. A perfusão é utilizada como uma técnica de descelularização, facilitando a conexão do agente com o material celular. O uso de gradiente de pressão é utilizado para complementar o tratamento enzimático e garantir preservação da estrutura. No processo de descelularização, o uso de dióxido de carbono supercrítico é

responsável por remover resíduos celulares, interromper a liofilização e alterar minimamente as propriedades mecânicas da MEC. Em situações de tecidos com menor vasculatura, são utilizados os processos de imersão e agitação.

Os autores concluem também que para conclusão do sucesso, ou não, do protocolo de descelularização utilizado, é necessário que a quantidade de DNA residual seja menor que 50ng/mg, fragmentos de DNA tenham tamanho menores que 200pb e que não haja material nuclear visível em tecidos corados. Desse modo, os agentes de descelularização podem ser utilizados isolados ou combinados e a escolha pelo melhor protocolo dependerá do tecido e órgão alvo, sendo necessário a avaliação dos benefícios e possíveis danos.

Keane et al. (2012) realizaram um estudo no qual utilizaram 3 diferentes protocolos de descelularização em MEC da submucosa do intestino delgado porcino (SIS) para avaliar as consequências de um protocolo ineficaz. No protocolo 1 (P1), a SIS foi tratada com 0,1% de ácido peracético por 2h em agitação, seguido de lavagens de 15 min com PBS, água deionizada, PBS e água deionizada. No protocolo 2 (P2), a SIS foi tratada como no protocolo 1, porém com 0,1% de ácido peracético por 1h. No protocolo 3 (P3), a SIS passou por 2h de lavagens de 15min com PBS, água deionizada, PBS e água deionizada. Todas amostras foram liofilizadas e esterilizadas com óxido de etileno. Para teste in vivo, macrófagos de camundongos foram semeados in vitro junto da MEC descelularizada por cada protocolo e, em seguida, foram implantados no tecido subcutâneo do abdome dos camundongos. Os animais foram sacrificados e a região de implante foi excisionada para avaliação. Em avaliação do resultado in vitro, não foi observado núcleos intactos por coloração em hematoxilina-eosina em P1 e P2, mas fragmentos de DNA foram observados em coloração fluorescente (DAPI) em P1. Quanto a concentração de DNA remanescente, P1 foi o que apresentou maior concentração, seguido de P3 e por último P2. Em relação à resposta dos macrófagos in vitro, as amostras submetidas ao P3 apresentaram maior resposta, seguido de P1 e P2. Quanto ao teste in vivo, a avaliação após 14 dias mostrou que na amostra implantada com P3, 21,3% das células eram macrófagos, e em P1 e P2 22,6% das células eram macrófagos. Desse modo, concluíram que a escolha do protocolo de descelularização está diretamente ligada a presença de remanescente celular em *scaffold*, o que pode desencadear processos inflamatórios e afetar a terapêutica.

Pellegata et al. (2012) através de um estudo realizado, desenvolveram um dispositivo para realização de descelularização automática de tecidos, garantindo a remoção celular e nuclear da MEC e mantendo sua composição e arquitetura. Determinaram pré-requisitos, como I) troca automática dos fluidos de descelularização; II) agitação; III) suportar diferentes tecidos e protocolos; IV) modularidade; V) temperatura regulável; VI) esterilidade; VII) fácil uso; VIII) fácil configuração. Como amostras, utilizaram de aortas abdominais de porcos lavadas com PBS contendo uma solução com 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 1% de anfotericina B (solução de AA). As amostras foram secas e congeladas a -80°C . As amostras foram descongeladas por 12h a -20°C e 4°C à noite e foram submetidas ao protocolo de descelularização dividido em 4 etapas. Na 1ª etapa foram lavadas com água destilada contendo solução de AA trocada a cada 2h durante 72h. Na 2ª etapa, os tecidos foram processados em desoxicolato de sódio (DCA) 4% por 4h seguido de 3 lavagens em água destilada com solução de AA. Na 3ª etapa as amostras foram processadas durante 3h em 2000 kU de DNase em 1mmol/L de cloreto de sódio (NaCl) e finalizada com 3 lavagens em água destilada com a solução de AA. Na 4ª etapa, as amostras foram imersas em PBS durante à noite. As amostras foram submetidas ao dispositivo teste tendo trocas automáticas da água destilada com solução de AA, enquanto DCA, DNase e PBS eram colocados manualmente. Em avaliação da eficácia do dispositivo e o protocolo utilizado, constataram, através de coloração histológica, que houve remoção completa de núcleos no final das 4 etapas, sem alterar os componentes fundamentais da MEC. Concluíram, então, que o dispositivo tem como finalidade automatizar o processo e reduzir erros humanos. O protocolo mecanizado foi eficaz tanto quanto o manual, porém ainda necessita de intervenção manual durante etapas e testes com outros protocolos de descelularização.

Traphagna et al. (2012) apresentaram um estudo no qual avaliaram a capacidade de utilizar a MEC de tecido dentário como *scaffold* natural para semear novas células e iniciar o processo de regeneração. Utilizaram de brotos de segundos e terceiros molares suínos extraídos e lavados em solução salina balanceada de Hanks (HBSS). Em seguida, foram colocados em solução de 0,01M Tris-HCl com 1mM EDTA a 4°C por 48h em constante agitação. Para o processo de descelularização, as amostras foram divididas e submetidas a 3 diferentes métodos,

sendo: I) amostras submetidas a dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% com inibidores de proteases por 24h, seguido de 3 ciclos de lavagem, sendo 30min cada, com 25mM de solução salina tamponada com Tris (TBS) a 24°C, seguido de um ciclo em TritonX-100 1% por 24h e 3 ciclos de lavagem por 30min cada, repetindo todo processo por 3 vezes. II) amostras submetidas a SDS 5% com inibidores de proteases por 24h, seguido de 3 ciclos de lavagem, sendo 30min cada, com 25mM de TBS a 24°C, seguido de um ciclo em TritonX-100 1% por 24h, seguido de um ciclo adicional que ocorreu 4 vezes com SDS 1%/lavagem/TritonX-100. III) semelhante ao segundo método, porém todo o processo utiliza apenas SDS 5%. Todas amostras foram tratadas com 3,6 U/ml de DNase I e 1,2 U/ml de RNase por 3h, com posterior inativação por calor a 75°C e lavagem com Tris-EDTA com pH 8, seguida de lavagem final com TBS por 3 vezes. Células mesenquimais dentais porcinas foram semeadas após processo de descelularização. Em avaliação histológica, as amostras descelularizadas apresentaram redução aparente na quantidade de núcleos. Amostras submetidas ao método III não apresentaram redução significativa no conteúdo de DNA, mas as amostras processadas com os métodos I e II apresentaram significativa redução. Constataram a presença de fibronectina, colágeno I, laminina e colágeno IV nas amostras submetidas aos métodos I e II. As amostras semeadas com células mesenquimais dentárias apresentaram fixação e proliferação celular, além do aumento de fibras de colágeno. Desse modo, concluíram que é possível o uso da MEC de tecido dentário como *scaffold* natural para regeneração do tecido dentário e que diante os métodos testados, o I e II apresentaram maior eficácia devido à capacidade de remoção do conteúdo celular.

Gilbert (2012) através de uma revisão de literatura, aponta que o foco da medicina regenerativa tem sido a ideia de descelularizar um órgão para que este sirva de estrutura para o desenvolvimento de um novo órgão. Aponta a matriz extracelular (MEC) como um potencial *scaffold* por ser reconhecível dentro e entre várias espécies e com capacidade de remoção de antígenos responsáveis por induzir rejeição imune. Ressalta ainda *scaffolds* resultantes da MEC da submucosa do intestino delgado e da bexiga urinária suína devido à sua leve espessura e facilidade em descelularização. Destaca também que o objetivo do processo de descelularização é isolar, dentro de um tecido, todos componentes da MEC sem que

haja perda, ruptura ou dano enquanto todo componente celular é removido. Para avaliação da eficácia da descelularização, alguns critérios foram descritos como guia útil, como a ausência de núcleos analisada através de coloração histológica, quantificação de DNA residual em menos de 50ng/mg e tamanho do fragmento de DNA abaixo de 200pb.

Os autores ainda afirmam que diversas técnicas podem ser empregadas de forma isolada ou combinada no processo de descelularização. Uso de choque térmico envolvendo congelamento-descongelamento, ultrassom e ruptura mecânica. Agitação e perfusão para transportar a solução de descelularização. Soluções iônicas de baixa e alta molaridade para induzir choque osmótico e rompimento das células. Detergentes iônicos, não-iônicos e zwitteriônicos, como dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e CHAPS, respectivamente, agem por solubilizar a membrana celular. Soluções alcalinas e ácidas, como o ácido peracético combinado com etanol 4%. Enzimas, como tripsina são usadas para interromper as interações entre células e MEC. Nucleases, principalmente DNase, são utilizadas para quebrar sequências de ácidos nucleicos facilitando sua remoção. Desse modo, o autor conclui que há diversos protocolos disponíveis, com resultados diferentes que também variam de acordo com o tecido alvo e que ainda necessita-se de estudos para alcançar desenvolvimento de melhores técnicas e maiores objetivos.

Mirzarafie et al. (2014) através de um estudo, buscaram desenvolver um protocolo de descelularização mais rápido em relação ao protocolo apresentado em um estudo de outros autores. No método já apresentado, o procedimento é realizado ao longo de 10 dias, envolvendo 3 trocas de tampão. Primeiramente as amostras foram submetidas a uma solução com 2% volume/volume (vol/vol) de TritonX-100 por 3 dias. Em seguida, trocaram o primeiro tampão por 0,1% peso/volume (p/vol) de SDS em 0,1M de NaCl. Após 5 dias, o segundo tampão foi substituído por água deionizada durante 3 dias. Este protocolo tende a resultar em remoção de até 93% de componentes celulares, mantendo colágeno I, III e IV, além de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibronectina, elastina e laminina da MEC. No presente estudo, os autores decidiram por eliminar etapas aparentemente insignificantes do protocolo apresentado. Para isso, as amostras foram agitadas a 4°C em TritonX-100 a 2% vol/vol por 24h, sendo o tampão trocado nas primeiras 4 horas e nas 4 horas seguintes. Após 1 dia, trocaram o tampão por 0,1% p/vol de SDS em 0,1M de NaCl

e mantiveram as amostras em agitação por 24h. Por último, o tampão SDS/NaCl foi trocado por água deionizada e as amostras continuaram em agitação a 4°C por 24h. Em avaliação, os autores constataram uma redução de 94% na concentração de DNA e redução de 89% na atividade enzimática. Desse modo, concluíram que o novo protocolo se equipara à eficácia do outro método apresentado anteriormente, porém sendo realizado em menor espaço de tempo. Os autores ainda não avaliaram a capacidade de suportar crescimento celular na MEC descelularizada obtida.

Farag et al. (2014) apresentaram um estudo sobre a capacidade de realizar regeneração periodontal através da descelularização de porções de tecido do ligamento periodontal. Utilizaram de terceiros molares extraídos para obtenção dos tecidos periodontais da região de terço médio das raízes. Uma membrana de policaprolactona (PCL), previamente passada por processo de eletrofiação, foi utilizada como *scaffold*. Para o protocolo de descelularização, usaram de uma solução com 30mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) 20mM e Triton X-100 0,5% perfundida bilateralmente através do *scaffold* por 1h. Em seguida, o material foi submetido a uma solução de DNase I 100U/mL em cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,9mM e cloreto de magnésio (MgCl₂) 0,5mM em PBS estéril por 1h. Por fim, foi lavado em água estéril a 37°C por 1h. Em avaliação histológica e ensaio de ELISA, constataram a presença de colágeno tipo I, fibronectina, fatores de crescimento, remoção de 92% do DNA e a integridade morfológica e estrutural da matriz extracelular. Além disso, o processo de recelularização apresentou aumento gradual e significativo de DNA. Sendo assim, concluíram a eficácia do uso da matriz de PCL, do processo de descelularização e da capacidade de regeneração das células do tecido periodontal.

Chen et al. (2015) realizaram um estudo com objetivo de obter regeneração da raiz dentária através da MEC da polpa dentária (DPEM) combinada com matriz dentinária tratada (TDM). DPEM e TDM foram obtidas de dentes suínos extraídos. Utilizaram, também, células-tronco do folículo dentário (DFSCs) suínas e humanas semeadas em meio de cultura. As amostras de tecido pulpar foram lavadas com PBS por 30min, seguido de imersão em solução contendo 100uni/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina, e foram divididas em grupo para o processo de descelularização. Cada grupo foi incubado, por períodos de tempo diferentes, em 1% de SDS por 15min, 30min, 1h, 6h, respectivamente. Em seguida, todas amostras

foram lavadas com água deionizada por 15min e, por fim, submetidas a 1% TritonX-100 em água deionizada por 30min. Enquanto a dentina e cemento resultantes da remoção do tecido pulpar e periodontal dos dentes extraídos foram tratadas com 17% EDTA por 10min, 10% EDTA por 10min e 5% EDTA por 5min, seguido de esterilização em PBS estéril por 72h e lavagem com água deionizada por 10min e por fim armazenados em meio de cultura. DFSCs humana foram semeadas em DPEM descelularizada. Utilizando um sistema de implante dentário, DPEM e TDM foram implantados em um alvéolo em mandíbula de porco por 12 semanas e extraídos para avaliação. Além disso, para teste in vivo, DPEM semeada com DFSCs humana foram implantadas subcutaneamente em camundongos. Como resultado, obtiveram túbulos dentinários internos expostos suficientemente para comprovar o sucesso da TDM. Após descelularização, a DPEM não teve sua estrutura alterada, núcleos foram removidos, proteínas preservadas e proliferação e diferenciação celular foram observadas. O processo de descelularização afetou apenas a coloração do tecido pulpar, de avermelhado para branco. Constataram também que a eficácia do protocolo se torna mais lenta com o decorrer do tempo. Quanto ao estudo in vivo, DPEM não apresentou total recelularização, porém notaram a formação de vasos sanguíneos e tecido semelhante ao tecido pulpar. Concluíram então que o processo de descelularização foi eficaz e a combinação de DPEM, TDM e DFSCs são capazes de regenerar a raiz dentária.

Gilpin e Yang (2017) analisaram que a relação entre falência de tecidos e órgãos e a quantidade de doadores está cada vez mais negativa e, por isso, pesquisaram métodos alternativos como a descelularização, preservando a matriz extracelular, sua estrutura bioquímica e biomecânica. No estudo presente, avaliaram-se o uso de métodos físicos, químicos ou combinatórios. Muito utilizado, os surfactantes como Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100, Desoxicolato de sódio (SD) e CHAPS, atuam através da lise celular, desarranjando a membrana celular. O SDS, mais comumente utilizado, apresenta padrão de remoção completa das células e, no mínimo, 90% do DNA, porém este pode ser agressivo às proteínas estruturais e de sinalização. O Triton X-100, não iônico, é utilizado como descelularizante sozinho, mas também no processo de lavagem para remoção de SDS remanescente. Já o tecido descelularizado por SD, apresentam células semeadas com maior atividade metabólica em relação ao SDS. CHAPS, por sua

vez, tem sua aplicação em processos de descelularização por perfusão e imersão. Quando se utiliza de protocolos com ácido e base, tem-se o uso de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido peracético. A descelularização, com o uso de enzimas, geralmente utilizam-se de DNase e RNase para hidrolisar DNA e RNA, respectivamente. Por outro lado, o método mecânico tem sido utilizado em virtude à preocupação de possível toxicidade dos produtos químicos. Esse método, utiliza, principalmente, da prática de congelamento-descongelamento; alta pressão hidrostática; uso de dióxido de carbono (CO₂). Com todas essas possibilidades de processos, vários são combinados com o objetivo de obter-se maiores resultados positivos. Desse modo, para avaliação do sucesso do processo de descelularização, utiliza-se o teste de imunogenicidade como um dos principais, sendo crucial que haja redução afim de impossibilitar uma rejeição das novas células inseridas no processo de recelularização, devido ainda a presença de antígenos. Além disso, a preservação das estruturas e suas respectivas funcionalidades também se tornam fundamentais.

Hu et al. (2017) realizaram um estudo clínico para avaliar as características de uma matriz extracelular (MEC) descelularizada de suínos. Tiveram como objetivo à busca por um *scaffold* adequado para realização de regeneração pulpar e o tratamento de doenças da polpa dentária. Utilizaram de 9 porcos, extraíndo 4 dentes anteriores inferiores de cada animal. Após exposição da polpa, lavaram-na com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 15min. Em seguida, mantiveram as polpas em água deionizada com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% trocada a cada 8h durante 32h. Removido o resíduo de SDS, depositaram as polpas em água desionizada com 1% Triton X-100 durante 2h e tratadas com 0,02mg/ml de DNase e 20mg/ml de RNase por 1h. Por fim, lavaram a polpa descelularizada com PBS por 2h e posteriormente colocada em solução com PBS, 10mg/ml de estreptomicina, 10.000 U/ml de penicilina G e 25µg/ml de anfotericina B por 12h. As polpas descelularizadas combinadas com células-tronco de polpa dentária humana foram transplantadas em camundongos. Observaram que as polpas mudaram da cor rosa para branco translúcido, componentes celulares foram totalmente removidos, mantendo a estrutura da MEC preservada, principalmente colágeno. Colágeno IV, laminina, fibronectina e integrina 1 foram expressos e distribuídos, porém vimentina reduziu após descelularização. Tecidos pulpares e estruturas vasculares foram

observadas na matriz recelularizada. Sendo assim, os autores concluíram que o protocolo de descelularização utilizado foi eficaz na remoção dos componentes celulares, preservando as proteínas e estruturas da MEC.

SONG et al. (2017) visando encontrar um potencial *scaffold* para celularização de células-tronco da papila apical, estudaram a possibilidade de descelularizar 3º molares extraídos e usá-los como *scaffolds* com capacidade de reproduzir a complexidade da matriz extracelular da polpa dentária. Armazenaram-se as amostras em solução salina de Hanks e congelaram-as em -80C, sendo, em seguida, descongeladas e submersas em Cloramina T 0,5%. Todo o processo de descelularização foi realizado em temperatura ambiente e com coquetel inibidor de protease. No final de cada protocolo, as amostras foram lavadas com EDTA 10% durante 5 minutos, seguido por 3 lavagens em solução salina de Hanks por 10 minutos cada. Foram feitos 3 protocolos distintos, sendo eles: P1 – 2% Triton X-100 e hidróxido de amônio (NH₄OH) por 72h; P2 – tampão hipertônico (0,01 M Tris-HCl, 1mm EDTA; pH 8,2) durante 48h e 3 ciclos de 1% SDS com 1% Triton X-100 durante 24 horas cada; P3 – 1 ciclo de 1% SDS com 1% Triton X-100 durante 24h a. A eficiência da descelularização foi avaliada pela remoção de DNA residual, HLA-A e β -actina. P1 e P3 apresentarem redução incompleta do DNA celular. P1 não apresentou redução do nível de fibronectina. P2 apresentou maior remoção dos componentes celulares do complexo polpa-dentária e redução no nível de fibronectina. Além disso, a MEC apresentou-se preservada tanto na composição quanto na morfologia, e as células-tronco de papila apical apresentaram proliferação e fixação. Desse modo, P2 apresentou resultados que demonstram ser possível descelularizar a polpa dentária humana, além de remover padrões moleculares antigênicos capazes de desencadear uma não auto-rejeição.

Schmitt et al. (2017) elaboraram um estudo para determinar um protocolo de descelularização de tecidos seguro e reprodutível, com preservação da estrutura da MEC e rede vascular, e assim serem utilizados como matrizes para a engenharia de tecidos. Para isso, utilizaram rins de ratos, após eutanásia, e congelados à 80°C em PBS de 4 a 12 semanas. No protocolo de descelularização, os rins foram descongelados, o tecido mole circundante removido e uma cânula, conectada em uma bomba de rolete controlada por pressão, foi fixada na artéria renal. O procedimento ocorreu em temperatura ambiente e com pressão de perfusão de

100mmHg. O protocolo, baseado em SDS, utilizou 3 rins para cada condição de concentração de SDS por tempo de perfusão e apresentou alterações controladas no tempo de perfusão e concentração de SDS. Iniciaram o processo com perfusão de 200ml de PBS por 10min em cada rim. As concentrações de SDS utilizadas foram de 0,25%; 0,5%; 0,66%; 1,0% para os tempos de perfusão de 30min; 60min; 120min. Em análise, constataram que a perfusão por 30min demonstrou ser insuficiente e não confiável. A perfusão por 1h com 0,66% de SDS apresentou descclularização completa e reprodutível. Todas concentrações, submetidas à 2h de perfusão, apresentaram descclularização completa nas 3 amostras. Para avaliação da rede vascular, utilizaram do corante Allura Red e concluíram que os rins descclularizados pelo processo de 0,66% SDS por 1h de perfusão apresentaram uma rede vascular intacta. A arquitetura principal da matriz manteve preservada em todas concentrações. Nenhuma amostra apresentou SDS residual após lavagem final com PBS. Após o procedimento, células osteoblásticas, previamente cultivadas, de fêmur humano foram semeadas nos rins descclularizados. Como resultado, obtiveram proliferação celular sem sinais de necrose ou apoptose. Concluíram que o protocolo com 0,66% SDS e 1h de perfusão apresentou melhores resultados e capazes de serem reprodutíveis.

Matoug-Elwerfelli et al. (2018) buscaram um método para descclularizar a polpa dentária com objetivo de utilizá-la em tratamento endodôntico regenerativo. Iniciaram o processo incubando os tecidos pulparem em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1% e aprotinina, sendo estes, inibidores de protease. Posteriormente, as amostras foram colocadas em dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,03% durante 24h com agitação constante. Os tecidos foram lavados com solução salina tamponada (PBS) e albumina bovina, contendo DNase e RNase durante 3h. Por fim, foi aplicado ácido peracético 0,1% por 3h para desinfecção dos tecidos. Desse modo, como resultado, apresentou-se remoção de 98% de DNA residual e remoção completa de leucócitos. Além disso, a matriz extracelular (MEC) teve sua histoarquitetura pulpar preservada e acelular. Colágeno tipo I e II também apresentaram suas estruturas mantidas após o processo. Junto a isso, os tecidos descclularizados não mostraram citotoxicidade e sem redução na atividade celular. Sendo assim, os autores concluíram que se faz possível a descclularização de todo

tecido pulpar, preservando a MEC e componentes estruturais, afim de utilizá-la no tratamento endodôntico regenerativo.

Alqahtani et al. (2018) fizeram um estudo clínico com objetivo de descelularizar a matriz extracelular (MEC) de uma polpa dentária suína para servir de *scaffold* na terapia de regeneração pulpar. Foram utilizados tecidos pulpares de molares extraídos de porcos. O tecido pulpar foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenado em -80°C . Em seguida, foi submetido à 0,02% de Tripsina, 0,05% de EDTA a 37°C por 1h. Em uma incubadora a vácuo, o tecido foi tratado com 3% de Triton X-100 por 30min, seguido de 4% de ácido desoxicólico por 30min. Após isso, o tecido foi lavado, 3 vezes, em água deionizada por 20min cada. Seguido de ácido peracético (PAA) 0,1% em etanol 4% por 30min. Lavagem final com PBS a 4°C trocado a cada 12h durante 2 dias. Utilizaram de 2 cães, por 2 semanas, para receber a MEC suína descelularizada através de uma abertura no forame apical, com infiltração de células periapicais. Para verificar a eficácia da descelularização, as amostras foram submetidas em testes histológicos verificando a presença de núcleos e DNA. Consideraram o processo bem-sucedido, não contendo núcleos visíveis, redução significativa de DNA, presença de proteínas e fatores de crescimento. Desse modo, concluíram ser eficaz o uso de MEC descelularizada como *scaffold* para regeneração pulpar.

Lee et al. (2020) a partir de um estudo clínico, desenvolveram *scaffolds* de polpas dentárias descelularizadas para avaliar seu potencial de desenvolvimento de células-tronco mesenquimais e sua capacidade biogeneradora. Para o estudo, os autores utilizaram 40 terceiros molares humanos extraídos e adicionados em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) com 2% de penicilina e estreptomicina a 4°C por 3h. As polpas extraídas da câmara pulpar foram submetidas a um agitador contendo Triton X-100 1% e hidróxido de amônio (NH_4OH) 0,1% a 4°C durante 7 dias, sendo a solução substituída a cada 24h. Feito isso, as polpas foram lavadas com água destilada, seguido de liofilização e esterilização com gás óxido de etileno. Para avaliar a presença de DNA residual, a polpa descelularizada foi fixada em solução de formalina neutra 10%, embebida e congelada por 2 dias, seguido de coloração histológica com hematoxilina e eosina para avaliação. A presença de colágeno foi quantificada com base na concentração de hidroxiprolina livre após hidrólise com ácido clorídrico das amostras. Sendo assim, concluíram que as polpas

descelularizadas resultaram, com sucesso, em matrizes acelulares com estruturas íntegras. Histologicamente, constataram ausência total de células residuais e redução de DNA próximo a zero. Além disso, concluíram que a polpa descelularizada apresentou proliferação celular significativo em curto prazo, indução de biomineralização e efeito estimulador na expressão gênica. Porém, o tamanho do tecido que será regenerado torna-se limitado devido ao tamanho da polpa.

Bakhtiar et al. (2021) avaliaram e apresentaram sete protocolos de descelularização da polpa dentária bovina e seus efeitos na matriz extracelular (MEC). Nestes protocolos foram utilizados Tripsina/EDTA por 1 hora, 24 horas ou 48 horas; Dodecil sulfato de sódio (SDS) por 24 horas ou 48 horas; TritonX-100. O objetivo dos autores é identificar métodos capazes de desenvolverem a regeneração de tecido saudável dentro dos canais radiculares através da diferenciação de células tronco da papila apical para procedimentos endodônticos regenerativos. Os dentes bovinos foram extraídos e mantidos a -80°C . Os tecidos pulpares foram cortados em pedaços de $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ e lavados com água desionizada, trocada a cada 15 minutos, durante 1 hora. As amostras foram submetidas a tratamento EDTA/tripsina e SDS a 1% por diferentes durações. Após serem lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por três horas, os tecidos foram submetidos a TritonX-100 por 1 hora. Foram realizados 7 diferentes protocolos, sendo eles: P1: 1h EDTA/Tripsina, 24h SDS 1%, 1h TritonX-100; P2: 1 h EDTA/Tripsina, 24h SDS 1%; P3: 48h SDS 1%, 1h TritonX-100; P4: 1h EDTA/Tripsina, 48h SDS 1%; P5: 1h EDTA/Tripsina, 48h SDS 1%, 1h TritonX-100; P6: 24h EDTA/Tripsina, 1h TritonX-100; P7: 12h EDTA/Tripsina, 1h TritonX-100. Todas amostras foram tratadas com DNase por 1 hora após serem lavadas com PBS por 24 horas. A avaliação das amostras foram realizadas a partir de análise de conteúdo de DNA, histológica, imunofluorescência e teste de imunogenicidade animal. Para a avaliação do DNA, utilizou-se de um mecanismo espectrofotométrico para sua quantificação. Amostras do P7 foram coradas com DAPI, marcador fluorescente, avaliando a ausência de ácidos nucleicos. Histologicamente, avaliou-se o colágeno, conteúdo celular e glicosaminoglicano (GAG). Todos protocolos apresentaram um processo de descelularização completo, além de conteúdo de DNA significativamente menor em relação à concentração de DNA da polpa nativa.

Os autores ressaltam ainda que a descelularização é um processo importante para eliminar a antigenicidade do xenoenxerto sem afetar a estrutura da MEC. Afirmam, também, a importância do uso de EDTA, junto à tripsina, para interromper a adesão celular na MEC durante a descelularização. Além disso, protocolos com uso de SDS são inconsistentes e apresentam risco de toxicidade residual. Exceto P7, todos outros protocolos reduziram o conteúdo de glicosaminoglicano, o qual apresenta papel importante no processo de regeneração. Somado a isso, todos protocolos apresentaram redução no conteúdo de DNA. Desse modo, P7 foi escolhido como protocolo ideal para testes adicionais, apresentando maior retenção de colágeno 1 e remoção quase completa dos núcleos celulares.

Kim et al. (2021) desenvolveram um estudo com objetivo de descelularizar um dente humano e utilizá-lo como *scaffold* para possível regeneração do tecido pulpar e do ligamento periodontal através de células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) e células-tronco da polpa dentária (DPSCs) de dentes humanos permanentes. Para o procedimento, as amostras foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e submersos em 0,5% de cloramina T por 2h a 4°C e depois lavadas em água fria. O tecido pulpar e o tecido do ligamento periodontal foram extraídos com lima endodôntica e cureta, respectivamente, e submetidos ao protocolo de descelularização. As amostras foram incubadas em 1% TritonX-100 por 24h, seguido de 1% de SDS por 24h. Este ciclo foi repetido três vezes e realizado com agitação constante e em temperatura ambiente com presença de coquetel inibidor de protease. Ao fim de cada ciclo, as amostras foram lavadas com EDTA 10% de pH 7,4 por 5min e depois lavadas 3 vezes com PBS por 10min cada. As amostras foram transplantadas em superfície dorsal de ratos imunocomprometidos para teste de recelularização in vivo. Durante avaliação de resultados, constataram histologicamente a recelularização por células-tronco do ligamento periodontal e do tecido pulpar de origem humana nas amostras descelularizadas, além da formação de tecido duro, nervos e vasos sanguíneos. Desse modo, concluíram que o dente humano descelularizado funciona como eficiente *scaffold* para regeneração tecidual e o processo de descelularização é adequado e eficaz, porém os resultados podem ser afetados devido o método de inoculação das células-tronco, tamanho da câmara pulpar e as diferentes áreas do ligamento periodontal.

Tan et al. (2021) realizaram um estudo com o objetivo de descelularizar a MEC da polpa dentária humana e avaliar a capacidade da proteína morfogenética óssea 4 (BMP4) em regular a regeneração pulpar através de células estromais da polpa dentária (DPSCs) e a MEC descelularizada. Tecidos pulpares de terceiros molares extraídos foram coletados e cultivados em meio de cultura com 15% de soro fetal bovino, 100 unidades de penicilina e 100mg de estreptomicina em atmosfera com 5% de CO₂. Um adenovírus recombinante expressando BMP4 humano (Ad-BMP4) foi pipetado nos meios de cultura. Polibreno foi utilizado para facilitar a transdução da infecção adenoviral. Para o processo de descelularização a polpa dentária foi lavada com PBS contendo heparina por 15min e depois colocada em PBS com 10% de SDS em agitação constante por 24h, tendo o PBS trocado a cada 8h. Feito isso, o tecido foi embebido em água ultrapura com 1% de TritonX-100 por 24h e lavado com PBS por 2h. Por fim, o tecido foi depositado em PBS com 10mg/ml de estreptomicina e 10 kU/ml de penicilina em PBS. A descelularização foi dada como positiva quando não virem núcleos através de coloração histológica. Após o processo, células estromais da polpa dentária foram inoculadas na MEC acelular ainda em placa de cultura e após 5 dias constataram que a BMP4 estimula a diferenciação odontogênica/osteogênica das DPSCs. Para teste in vivo, as DPSCs contendo Ad-BMP4 em MEC descelularizada foram transplantadas via injeção subcutânea em camundongos. Para avaliação, os animais foram sacrificados e o local de transplante foi excisado e desmineralizado com EDTA 10%. Como resultado, observaram a formação de tecido conjuntivo fibroso com distribuição de fibroblastos, vasos sanguíneos e tecido adiposo. A MEC não apresentou núcleos celulares visíveis após procedimento de descelularização. No tecido do camundongo foi notado presença de tecido pulpar. O uso de BMP4 resultou em maior expressão de proteína de matriz de dentina, colágeno I, osteopontina e fator de crescimento endotelial vascular. Concluíram então que o uso de BMP4 acelera o processo de diferenciação osteo-odonto-angiogênica das DPSCs. Ainda afirmaram que a MEC descelularizada junto a DPSCs é capaz de regenerar tecido pulpar vascularizado.

Khurshid et al. (2022) apresentaram uma revisão de literatura sobre a possibilidade do uso da polpa dentária descelularizada como *scaffold* para a endodontia regenerativa. Destacaram, ainda, a necessidade de garantia da vitalização pulpar mediada pela regeneração do tecido através de células-tronco,

substituindo o tecido danificado por outro saudável e preservando a integridade estrutural e biológica da polpa e estrutura dentária. Descreveram o processo de descelularização como um procedimento que visa manter a MEC em sua estrutura e característica original, mas eliminando o conteúdo celular do tecido, através de técnicas que possam ser químicas e/ou enzimáticas. Desse modo, concluíram que a polpa dentária humana é capaz de regenerar sendo utilizada como *scaffold* após processo de descelularização, porém ainda é limitado a capacidade de mimetizar a MEC da polpa dentária.

Phothichailert et al. (2022) realizaram um estudo para avaliar a eficácia da atividade biológica na diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco da papila apical (SCAPs) da MEC descelularizada derivada de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) tratada com a proteína Jagged 1, capaz de ativar a sinalização Notch, responsável por regular a formação, cicatrização e regeneração óssea. A polpa dentária e o tecido da papila apical foram coletados de terceiros molares extraídos e, em seguida, as células foram isoladas dos tecidos e cultivadas em meio de cultura contendo Jagged 1. Para o processo de descelularização, as amostras foram incubadas em 0,5% TritonX-100 em 20mM de hidróxido de amônio (NH₄OH) por 5 a 10 min, seguido de lavagem com PBS contendo inibidor de protease e outra lavagem com PBS contendo 0,0025% de DNase. Em teste de coloração e avaliação microscópica, comprovaram a ausência de núcleos na MEC descelularizada e confirmaram o sucesso do processo de descelularização. SCAPs foram semeadas na MEC descelularizada derivada de hDPSCs. Durante análise, constataram que as hDPSCs tratadas com Jagged 1 aumentaram de forma significativa a expressão de genes responsáveis pela organização da MEC, comparado ao grupo controle sem Jagged 1. A atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) também foi maior, o que resultou em maior mineralização. Observaram também maior disposição de glicosaminoglicanos (GAGs). Desse modo, os autores afirmaram que o protocolo de descelularização foi eficaz para remoção do conteúdo celular e retenção das principais proteínas da MEC, sendo capaz de receber nova recelularização. Concluíram ainda que o uso da proteína Jagged 1 foi positivo e acelerou o processo de diferenciação odonto/osteogênica das células-tronco dentárias e a mineralização devido a ativação da via de sinalização Notch.

4 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura revisada, o processo de descelularização tem-se destacado quando o foco se trata de medicina regenerativa. A descelularização de um órgão ou tecido tem como objetivo usá-lo como *scaffold* para desenvolvimento de um novo tecido ou órgão (GILBERT, 2012; KHURSHID et al., 2022).

A decisão pelo uso da MEC como *scaffold* de primeira escolha pode ser explicado devido sua capacidade de influenciar mitose, quimiotaxia celular, diferenciação celular direta e a indução de remodelação do tecido hospedeiro (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Além disso, a MEC apresenta a vantagem de ser reconhecível dentro e entre diversas espécies e capacidade de remoção de antígenos responsáveis por induzir rejeição imune (GILBERT, 2012).

Para a realização de estudos clínicos testando o potencial dos protocolos de descelularização, alguns autores usaram de material de origem suína (ALQAHTANI et al., 2018; CHEN et al., 2015; HU et al., 2017; KEANE et al., 2012; PELLEGATA et al., 2012; TRAPHAGENA et al., 2012), roedora (CHEN et al., 2015; HU et al., 2017; KIM et al., 2021; KEANE et al., 2012; SCHMITT et al., 2017; TAN et al., 2021) e bovina (BAKHTIAR et al., 2021). Keane et al. (2012) com o objetivo de avaliar as consequências de protocolos ineficientes, optaram por usar MEC da submucosa do intestino delgado suíno. Pellegata et al. (2012) utilizaram aortas abdominais suínas para testar o novo dispositivo capaz de realizar a descelularização de forma automática desenvolvido por eles. Já Alqahtani et al. (2018), Chen et al. (2015), Hu et al. (2017) e Traphagena et al. (2012) lançaram mão de dentes suínos extraídos e suas respectivas polpas dentárias. Por outro lado, Schmitt et al. (2017) usaram rins de rato para testar um possível protocolo de descelularização seguro e reprodutível. Bakhtiar et al. (2021) utilizaram de polpa dentária bovina para testar e avaliar 7 protocolos. Para teste in vivo, segundo a revisão de literatura, os *scaffolds* obtidos junto às novas células para regeneração foram injetados subcutaneamente em camundongos, exclusivamente (CHEN et al., 2015; HU et al., 2017; KIM et al., 2021; KEANE et al., 2012; TAN et al., 2021).

Os estudos clínicos usando polpas dentárias humanas obtidas através de dentes extraídos, principalmente terceiros molares, se destacaram como a maioria

considerando a literatura revisada. Nesses estudos, a polpa dentária foi alvo dos protocolos de descelularização com o objetivo de servir como *scaffold* para semeadura de novas células (CORDEIRO et al., 2008; FARAG et al., 2014; KIM et al., 2021; LEE et al., 2020; MATOUG-ELWERFELLI et al., 2018; PHOTHICHAILERT et al., 2022; SONG et al., 2017; TAN et al., 2021; TRAPHAGENA et al., 2012).

Para a realização do processo de descelularização, faz-se necessário o uso de métodos e/ou agentes que podem ser utilizados de forma combinada ou isolada. Abrasão mecânica; congelamento-descongelamento (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; GILPIN; YANG, 2017); perfusão; imersão; agitação; são exemplos de métodos. Porém, baseado na revisão de literatura, os agentes como ácidos e bases (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012); agentes quelante (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; GILPIN; YANG, 2017); agentes antimicrobianos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012); soluções hipotônicas e hipertônicas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012); detergentes iônicos, zwitteriônicos e não-iônicos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; GILPIN; YANG, 2017); álcoois (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012); enzimas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; GILPIN; YANG, 2017); são agentes que podem ser usados de forma isolada ou combinada no processo (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012). Assim, há variados protocolos disponíveis com resultados diferentes, variando de acordo com o tecido ou órgão alvo.

O uso de alguns métodos favorece o processo de descelularização. Abrasão mecânica junto a solução hipertônica, enzimas e agente quelante atua, através de força e pressão, na eliminação de células superficiais, porém pode causar danos à estrutura da MEC. Perfusão facilita a interação entre células e agentes descelularizantes. Dióxido de carbono supercrítico interrompe a liofilização e remove resíduos celulares afetando minimamente a arquitetura da MEC. O uso de gradiente de pressão preserva a estrutura da MEC e complementa a função enzimática na descelularização. Processo de congelamento-descongelamento atua na lise celular, mas apresenta baixa efetividade quando não associado a outro processo. (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012).

SDS, CHAPS e TritonX-100 são exemplos de detergentes iônicos, zwitteriônicos e não-iônicos, respectivamente. São usados para dissociar DNA e proteínas, podendo causar danos às proteínas da MEC, e também para solubilizar a membrana celular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; GILPIN; YANG, 2017). Crapo, Gilbert e Badylak (2011) compararam e concluíram que o TritonX-100 apresenta maior capacidade de remover conteúdo celular em tecidos mais espessos. Já o SDS garante melhor remoção de DNA, porém pode eliminar fatores de crescimento e afetar a estrutura da MEC. Além disso, o TritonX-100 pode ser usado como descelularizante de modo isolado e também para remoção de SDS residual através de um processo de lavagem (BAKHTIAR, 2021; GILPIN; YANG, 2017)

Glicerol, etanol e acetona são álcoois utilizados com objetivo de remover lipídios, causar desidratação e lise celular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Nucleases, lipases, colagenases (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011) e tripsina (ALQAHTANI et al., 2018; BAKHTIAR et al., 2021; GILBERT, 2012) são enzimas que auxiliam na remoção celular, porém com pouco efeito quando usadas isoladas. Sendo assim, as enzimas geralmente são associadas a agentes quelantes, como o EDTA, responsáveis por dissociar células e proteínas na MEC, mas com incapacidade de remover células mais superficiais (BAKHTIAR et al., 2021; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012). Desse modo, o uso combinado de enzimas e EDTA se completam.

Crapo, Gilbert e Badylak (2011) realizaram uma revisão de literatura destacando alguns agentes, como os ácidos, que possam ser utilizados no processo de descelularização. O ácido peracético destacou como comumente usado devido ao seu potencial de remoção do material genético residual, além de apresentar mínimo dano à estrutura e composição da MEC. Keane et al. (2012), para tratar a submucosa do intestino delgado suíno, usaram 0,1% de ácido peracético por 2h no protocolo 1 e por 1h no protocolo 2. Ao passo que Matoug-Elwerfelli et al. (2018) utilizaram o ácido na concentração de 0,1% por 3h no final do processo de descelularização para desinfecção. Enquanto Gilbert (2012) e Alqahtani et al. (2018) citam ainda a associação do ácido peracético com etanol 4%. O uso de ácido polilático (PLLA) no processo descelularização da polpa dentária no estudo clínico

de Cordeiro et al. (2008) foi apontado por contribuir na diferenciação das SHED no processo de recelularização devido a mobilização de proteínas.

Com a finalidade de causar desidratação, lise celular e remoção de lipídios (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011), o etanol foi usado de forma isolada em concentrações de 100%, 90%, 80% e 70% por 5min em cada encubação dos *scaffolds* para hidrofilição (CORDEIRO et al., 2008). Enquanto o mesmo é citado por Gilbert (2012) e usado por Alqahtani et al. (2018) na concentração de 4% em associação com ácido peracético.

Antimicrobianos usados para eliminação de possíveis microrganismos indesejáveis são utilizados tanto no início quanto no fim de protocolos de descelularização. Chen et al. (2015) imergiram, inicialmente, as amostras de polpa dentária em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 100uni/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina. À medida que Hu et al. (2017) submeteram a polpa já descelularizada em solução PBS com 10mg/ml de estreptomicina, 10.000U/ml de penicilina e 25µg/ml de anfotericina por 12h. Enquanto Tan et al. (2021) depositaram o tecido descelularizado em solução PBS com 10mg/ml de estreptomicina e 10kU/ml de penicilina. Ao tempo que Lee et al. (2020) adicionaram as amostras de dentes extraídos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) com 2% de penicilina e estreptomicina por 3h. Por último, Pellegata et al. (2012) lavaram as amostras de aortas abdominais suínas com solução de PBS com 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 1% de anfotericina.

Enzimas nucleases, como DNase e RNase, tem a finalidade de romper a cadeia de DNA e RNA, respectivamente (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Traphagna et al. (2012) trataram as amostras com 3,6 U/ml de DNase e 1,2 U/ml de RNase por 3h. À medida que Hu et al. (2017) trataram as polpas dentárias com 0,02mg/ml de DNase e 20mg/ml de RNase por 1h. Entretanto, Matoug-Elwerfelli et al. (2018) lavaram as amostras com PBS contendo 50U/ml de DNase e 1U/ml de RNase por 3h.

Por outro lado, alguns estudos usaram apenas DNase, como Pellegata et al. (2012) que, durante a descelularização, processaram as amostras em 2000 kU de DNase em 1mmol/L de cloreto de sódio (NaCl) durante 3h. Enquanto que Farag et

al. (2014) submeteram as amostras em solução de PBS com 100U/ml de DNase com 0,9mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) e 0,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂). Ao tempo que Phothichailert et al. (2022) lavaram as amostras, ao final do processo, com solução de PBS contendo 0,0025% de DNase.

Soluções salinas, como solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina tris tamponada (TBS) e solução salina balanceada de Hanks (HBSS), são utilizadas no processo de descclularização para tratamento das amostras, lavagem de resíduo celular, auxiliar na dissociação entre DNA e proteínas, além de que PBS e TBS funcionam como solução tampão (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Quanto ao uso do TBS, apenas Traphagena et al. (2012) usaram 25mM de TBS em solução para a lavagens de 30min cada ciclo, tanto no método I quanto no método II de descclularização.

Em relação ao HBSS, Traphagena et al. (2012) utilizaram ainda do HBSS para lavagem antecedendo o processo de descclularização. Por outro lado, Song et al. (2017) congelaram as amostras imersas em HBSS em -80°C para posterior descongelamento e início do processo de descclularização e, no final de cada protocolo testado, as amostras foram lavadas com HBSS por 3 ciclos de 10min cada. Entretanto, Lee et al. (2020) imergiram, inicialmente, as amostras em HBSS contendo 2% de penicilina e 2% de estreptomicina por 3h.

Tratando-se do uso de PBS, todos estudos, baseado na literatura revisada, os quais usaram da solução, utilizaram dela no final dos processos, porém nem todos utilizaram no início. Cordeiro et al. (2008), por exemplo, mantiveram as amostras em PBS durante o período da noite para uma lavagem final. Assim como Keane et al. (2012) realizaram uma lavagem final das amostras submetidas aos 3 diferentes protocolos distintos por 2h, sendo em ciclos de 15min cada. Já Farag et al. (2014) também realizaram apenas lavagem final com PBS contendo DNase, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio por 1h. Por sua vez, Matoug-Elwerfelli et al. (2018) fizeram a lavagem final das amostras com PBS contendo DNase e RNase por 3h. Phothichailert et al. (2022) submeteram as amostras em duas lavagens finais com PBS, sendo a primeira com inibidor de protease e a segunda com DNase.

Em contrapartida, Pellegata et al. (2012) realizaram uma lavagem inicial das amostras em PBS contendo 1% penicilina, 1% estreptomicina e 1% anfotericina, além de lavagem final com as amostras imersas em PBS durante a noite. Enquanto que Chen et al. (2015) lavaram as amostras no início do processo por 30min e no final, após uso de EDTA, por 72h. Ao mesmo tempo que Hu et al. (2017) inicialmente lavaram as amostras de polpa por 15min e, ao fim, deixaram as amostras em PBS contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina por 12h.

Alqahtani et al. (2018), por sua vez, realizaram lavagem inicial das amostras com PBS e lavagem final durante 2 dias, sendo a solução trocada a cada 12h. Já Bakhtiar et al. (2021) lavaram as amostras inicialmente por 3h e, após a descelularização, fizeram a lavagem final por 24h. Kim et al. (2021), entretanto, submeteram as amostras em lavagem inicial por 2h e em uma lavagem final sendo 3 ciclos de 10min cada.

Por outro lado, Tan et al. (2021) realizaram uma lavagem inicial das amostras com PBS contendo heparina por 15min, seguido de outra lavagem com PBS contendo 10% SDS por 24h, tendo o PBS trocado a cada 8h. Fizeram ainda uma lavagem final com PBS contendo estreptomicina e penicilina. Diferente dos demais, Schmitt et al. (2017) realizaram uma perfusão inicial de 200ml de PBS durante 10min nas amostras de rim e, além disso, fizeram uma lavagem final para remoção residual.

O EDTA, agente quelante, faz-se bastante presente em relação aos estudos revisados. Sendo apresentado de forma isolada ou associado a outros agentes. Traphagna et al. (2012) colocaram as amostras em solução de 0,01M de Tris-HCl com 1mM de EDTA a 4°C em constante agitação por 48h. Enquanto que Song et al. (2017), no protocolo 2, usaram 1mM EDTA associado a 0,01M de Tris-HCl durante 48h, além de lavarem todas as amostras, dos 3 protocolos, com EDTA 10% por 5min.

Quanto à associação de EDTA e enzimas, Alqahtani et al. (2018) submeteram as amostras, após lavagem inicial, em uma solução com 0,05% EDTA e 0,02% tripsina. Ao mesmo tempo que Bakhtiar et al. (2021) usaram a associação de EDTA e tripsina nos protocolos P1, P2, P4 e P5 por 1h, em P6 por 24h e P7 por 12h. Em

contrapartida, Matoug-Elwerfelli et al. (2018) incubaram as amostras em EDTA 0,1% contendo aprotinina.

Em relação ao uso isolado do EDTA, Kim et al. (2021) usaram 10% EDTA para lavagem final durante 5min, seguido de outra lavagem com PBS. Enquanto que Chen et al. (2015) expuseram as amostras em diferentes concentrações e tempo, sendo 17% EDTA por 10min, seguido de 10% EDTA por 10min e, por fim, 5% EDTA por 5min.

Tratando do uso de detergentes iônicos e não-iônicos, SDS e TritonX-100 respectivamente, têm se destacado quanto ao uso na literatura revisada. Quanto ao SDS, Traphagena et al. (2012) submeteram as amostras de P1 em SDS 1% junto de inibidores de proteases por 24h e as amostras de P2 e P3 em SDS 5% com inibidores de proteases por 24h. Já Mirzarafie et al. (2014) mantiveram as amostras em solução com 0,1% SDS e 0,1M de cloreto de sódio (NaCl) por 24h.

De outro modo, Schmitt et al. (2017) expuseram as amostras em SDS com concentrações e durações diferente, sendo 0,25%, 0,5%, 0,66% e 1% durante 30min, 60min e 120min. Enquanto que Chen et al. (2015) colocaram as amostras, dos 4 grupos, em SDS 1% com durações de 15min, 30min, 1h e 6h, respectivamente.

O uso de SDS em longas durações mostrou-se presente no estudo de Matoug-Elwerfelli et al. (2018), no qual os autores mantiveram as amostras em SDS 0,03% com constante agitação por 24h. Ao mesmo tempo que Bakhtiar et al. (2021) usaram 1% SDS por 24h em P1 e P2 e 48h em P3, P4 e P5. Por outro lado, Tan et al. (2021) submeteram as amostras em uma concentração maior de SDS por longa duração, sendo 10% SDS durante 24h.

Houveram ainda, associação de SDS com TritonX-100 como no estudo de Song et al. (2017), no qual as amostras de P2 foram incubadas em solução de 1% SDS com 1% TritonX-100 por 3 ciclos, sendo 24h cada, e P3 em apenas 1 ciclo da mesma solução. Entretanto, Kim et al. (2021) iniciaram o processo de descelularização submetendo as amostras em 1% TritonX-100 por 24h seguido de 1% SDS por 24h.

O detergente não-iônico TritonX-100 apresentou-se usado em diferentes concentrações e durações, segundo a literatura revisada. Traphagna et al. (2012) utilizaram o detergente em concentração de 1% durante 24h em seus 3 diferentes métodos. Enquanto que Mirzarafie et al. (2014) submeteram as amostras em 2% TritonX-100 por 3 dias no início de seu protocolo. Já Alqahtani et al. (2018) trataram as amostras de polpa com 3% TritonX-100 por 30min.

Chen et al. (2015) por sua vez, usaram 1% TritonX-100 em água deionizada por 30min para lavagem das amostras. À medida que Hu et al. (2017) depositaram as amostras de polpa em água deionizada com 1% TritonX-100 por 2h. Por outro lado, Bakhtiar et al. (2021) utilizaram o TritonX-100 durante 1h para lavagem de SDS nos protocolos P1, P3, P5, P6, P7.

Ainda, Tan et al. (2021) embeberam as amostras em água contendo 1% TritonX-100 por 24h, seguido de lavagem com PBS por 2h. Enquanto que Kim et al. (2021) incubaram as amostras em 1% TritonX-100 por 24h, seguido de 1% SDS por 24h.

A associação de TritonX-100 e hidróxido de amônio (NH₄OH) foi utilizada em alguns estudos da literatura, como Farag et al. (2014) usaram uma solução de 30ml contendo NH₄OH 20mM e 0,5% TritonX-100. Ao mesmo tempo que Song et al. (2017) submeteram as amostras de P1 à 2% TritonX-100 com NH₄OH por 72h. Por sua vez, Lee et al. (2020) depositaram as amostras de polpa em um agitador com 1% TritonX-100 e NH₄OH 0,1% durante 7 dias. Ao passo que Phothichailert et al. (2022) incubaram as amostras em 0,5% TritonX-100 com 20mM de NH₄OH por 10min.

Como constatação da eficácia dos protocolos de descelularização e a quantificação dos danos à MEC, diferentes autores, baseado na literatura revisada, relataram a presença e preservação de alguns componentes importantes da MEC, como fibronectina (FARAG et al., 2014; HU et al., 2017; SONG et al., 2017; TRAPHAGENA et al., 2012), colágeno I (FARAG et al., 2014; MATOUG-ELWERFELLI et al., 2018; TAN et al., 2021; TRAPHAGENA et al., 2012), laminina (HU et al., 2017; TRAPHAGENA et al., 2012) colágeno IV (HU et al., 2017;

TRAPHAGENA et al., 2012) e fatores de crescimento (ALQAHTANI et al., 2018; FARAG et al., 2014; TAN et al., 2021).

Alguns autores semearam células-tronco cultivadas em seus respectivos *scaffolds* obtidos objetivando a recelularização e, por conseguinte, avaliar também o sucesso do processo de descelularização. Hu et al. (2017) e Kim et al. (2021) semearam células-tronco da polpa dentária em seus respectivos *scaffolds*. Enquanto que Tan et al. (2021) semearam células-tronco da polpa dentária associada a proteína morfogenética óssea-4 (BMP4) e Phothichailert et al. 2022 semearam células-tronco da polpa dentária tratada com proteína Jagged-1.

Por outro lado, Song et al. (2017) e Bakhtiar et al. (2021) semearam células-tronco da papila apical. Já Cordeiro et al. (2008) e Chen et al. (2015) usaram de células-tronco de dentes esfoliados. Entretanto, Traphagena et al. (2012) utilizaram de células-tronco dentais de origem porcinas, devido ao seu trabalho com suínos.

Quanto à remoção de material genético, a quantificação de DNA residual deve ser menor que 50ng/mg, os fragmentos de DNA não devem ter mais que 200pb e não deve haver material nuclear visível histologicamente (GILBERT, 2012).

Para avaliação da eficácia e sucesso do protocolo escolhido e a previsibilidade de todo processo, o teste de imunogenicidade é considerado como um dos principais avaliadores (GILPIN; YANG, 2017).

Desse modo, com base na literatura revisada, foi possível compreender diversos protocolos, porém sem poder concluir qual seria melhor visto que todos apresentaram eficácia na descelularização. Além disso, a literatura demonstrou carência de testes in vivo em humanos para avaliar os prós e contras na prática clínica.

5 CONCLUSÃO

Com base na literatura revisada, pode-se concluir que há diversos protocolos de descelularização diferentes que usam de uma gama de agentes em variadas concentrações, tempo e sequência. Mesmo assim, todos estudos apresentaram sucesso em seus protocolos para transformar a polpa dentária em *scaffold*. Exceto Keane et al. (2012) não tiveram sucesso, pois tinham como objetivo avaliar as consequências de um protocolo ineficaz. Porém, ainda se faz necessário a realização de estudos clínicos padronizados e meios para superarem as dificuldades do teste in vivo para descelularização da polpa dentária e sua posterior regeneração.

REFERÊNCIAS

- ALQAHTANI, Q et al. Decellularized Swine Dental Pulp Tissue for Regenerative Root Canal Therapy. **J Dent Res**, v.97, n.13, p.1460-1467, aug-dez 2018.
- BAKHTIAR, H. et al. Optimizing Methods for Bovine Dental Pulp Decellularization. **Journal of Endodontics**, v.47, n.1, p.62-68, 2021
- CHEN, G. et al. Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. **Biomaterials**, v.52, p.56-70, Jun 2015.
- CORDEIRO, M.M. et al. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. **J Endod**, v.34, n.8, p. 962-969, Aug 2008.
- CRAPO, P. GILBERT, T.W. BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n.12, p. 3233-3243, Apr 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3084613/pdf/nihms-271881.pdf>>. Acessado em: 29/10/2022
- FARAG, C. et al. Decellularized Periodontal Ligament Cell Sheets with Recellularization Potential. **J Dent Res**, v. 20, n.10, p. 1-7, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462801/pdf/10.1177_0022034514547762.pdf> Acessado em: 18/10/2022.
- GILBERT, T.W. Strategies for tissue and organ decellularization. **J Cell Biochem**, v. 113, n. 7, p. 2217-2222, Jul 2012.
- GILPIN, A., YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **Biomed Res Int**, v.2017, 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5429943/pdf/BMRI2017-9831534.pdf>> Acessado em: 19/10/2022.
- HU, L. et al. Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **Biomed Res Int**, v. 2017, 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5745671/pdf/BMRI2017-9342714.pdf>>. Acessado em: 17/10/2022.
- KEANE, T.J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v.33, n.6, p.1771-1781, Feb 2012
- KHURSHID, Z. et al. Future of Decellularized Dental Pulp Matrix in Regenerative Endodontics. **Eur J Dent**, 2022.
- KIM, I. et al. In Vivo Evaluation of Decellularized Human Tooth Scaffold for Dental Tissue Regeneration. **Appl Sci (Basel)**, v. 11, n. 18, Sep 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9397400/pdf/nihms1802167.pdf>>. Acessado em: 27/10/2022

LEE, D.J. et al. Decellularized pulp matrix as scaffold for mesenchymal stem cell mediated bone regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 11, p. 1-13, Nov 2020. Disponível em:

<<https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/2041731420981672>>. Acessado em: 21/10/2022

MATOUG-ELWERFELLI, M. et al. A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. **Int Endod J**, v.51, n.6, p. 663-673, 2018

MIRZARAFIE, A. et al. A Fast and Mild Decellularization Protocol for Obtaining Extracellular Matrix. **Rejuvenation Research**, v. 17, n. 2, 2014.

PELLEGATA, A.F. et al. A novel device for the automatic decellularization of biological tissues. **Int J Artif Organs**, v.35, n.3, p.191-198, Mar 2012.

PHOTHICHAILERT, S. et al. Effects of decellularized extracellular matrix derived from Jagged1-treated human dental pulp stem cells on biological responses of stem cells isolated from apical papilla. **Front Cell Dev Biol**, v. 10, Aug 2022.

SCHMITT, A. et al. Optimized protocol for whole organ decellularization. **Eur J Med Res**, v. 22, n. 1, Sep 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5591503/pdf/40001_2017_Article_272.pdf> Acessado em: 19/10/2022.

SONG, J. S. et al. Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, v.96, n.6, p. 640-646, Jun. 2017.

TAN, Q. et al. BMP-4 regulated human dental pulp stromal cells promote pulp-like tissue regeneration in a decellularized dental pulp matrix scaffold. **Odontology**, v.109, n. 4, p. 895-903, Oct 2021.

TRAPHAGENA, S.B. et al. Characterization of Natural, Decellularized and Reseeded Porcine Tooth Bud Matrices. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p.5287-5296, Jul 2012.

Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374342/pdf/nihms375348.pdf>>. Acessado em: 25/10/2022.