UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JAIRO BARROS WEISS

Descelularização da polpa dentária suína de dentes em diferentes estágios de desenvolvimento: caracterização histológica e bioquímica de matrizes extracelulares.

Juiz de Fora

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JAIRO BARROS WEISS

Descelularização da polpa dentária suína de dentes em diferentes estágios de desenvolvimento: caracterização histológica e bioquímica de matrizes extracelulares.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcio Resende do Carmo

Juiz de Fora

2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Barros Weiss, Jairo.
Descelularização da polpa dentária suína de dentes em diferentes estágios de desenvolvimento: caracterização histológica e bioquímica de matrizes extracelulares. / Jairo Barros Weiss. -- 2026.
79 f.

Orientador: Antonio Marcio Resende do Carmo
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2026.

1. Polpa Dentária. 2. Descelularização. 3. Endodontia. 4. Histologia. 5. Matriz Extracelular. I. Resende do Carmo , Antonio Marcio , orient. II. Título.

Jairo Barros Weiss

Descelularização da polpa dentária suína de dentes em diferentes estágios de desenvolvimento: caracterização histológica e bioquímica de matrizes extracelulares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em 24 de setembro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo - Orientador e Presidente da Banca
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof.ª Dr.ª Aline Spagnol Fedoce Silva - Membro Titular Interno
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Warley Oliveira Silva - Membro Titular Interno
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof.ª Dr.ª Priscila Silva Grijó Farani - Membro Titular Externo
University of Texas at El Paso - UTEP - Estados Unidos

Dr.ª Camila Maurmann de Souza - Membro Titular Externo
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Juiz de Fora, 01/09/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Antonio Marcio Resende do Carmo**, **Professor(a)**, em 25/09/2026, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **ALINE SPAGNOL FEDOCE SILVA**, **Professor(a)**, em 25/09/2026, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Warley Oliveira Silva**, **Professor(a)**, em 25/09/2026, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila Silva Grijo Farani**, **Usuário Externo**, em 25/09/2026, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Camila Maurmann de Souza**, **Usuário Externo**, em 25/09/2026, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3190224** e o código CRC **831D08B2**.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese só foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas e instituições, às quais expresso minha sincera gratidão.

Em primeiro lugar, os meus pais, Jayro e Lucilea, que já não estão entre nós, deixo minha eterna gratidão. Seus ensinamentos, valores e exemplos de vida continuam a me inspirar e a guiar minhas escolhas. Esta conquista também é dedicada à memória deles.

À minha noiva, Rayla, agradeço pelo amor, pela compreensão e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Sua presença foi essencial para que eu mantivesse a motivação e a serenidade durante esta caminhada.

Aos meus familiares (especialmente minha irmã Denise) e amigos, agradeço pelas palavras de encorajamento e pelos momentos de alegria que ajudaram a equilibrar o caminho acadêmico com leveza.

Agradeço ao meu orientador pelo incentivo constante ao longo de todo o processo. Sua experiência e conselhos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Carlos Maranduba, Marizia Trevizani e demais colegas do GENETEC, obrigado por me receber em seus laboratórios!

Aos componentes da banca, meus agradecimentos por dedicarem seu tempo em ler e avaliar este trabalho.

RESUMO

A descelularização tecidual permite obter arcabouços de matriz extracelular (MEC) com potencial aplicação em engenharia tecidual e em procedimentos endodônticos regenerativos. A polpa dentária suína, material descartado pela indústria alimentícia, é uma fonte ainda pouco explorada para esse fim. O objetivo deste estudo foi descelularizar polpas dentárias suínas de dentes em diferentes estágios de desenvolvimento e verificar qual delas preserva melhor as características estruturais de sua MEC. Hemiarcadas suínas foram obtidas em abatedouros certificados, e foram coletadas polpas de molares permanentes erupcionados, com raiz formada (M1), e de molares intraósseos em formação (M2). As polpas foram submetidas a um protocolo de descelularização com EDTA 0,1% e Tris 10 mM, seguido de SDS 0,1% em Tris 10 mM, intercalado por lavagens em PBS. Os tecidos in natura e descelularizados foram avaliados por quantificação de DNA, quantificação de colágeno pelo método da hidroxiprolina, microscopia de fluorescência (DAPI), análise histológica (hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson) e microscopia eletrônica de varredura (MEV); a anatomia dos dentes foi avaliada por tomografia computadorizada. A polpa de M2 forneceu maior massa por dente (1,168 g, contra 0,377 g em M1). O protocolo reduziu em média 99% do DNA nos dois grupos, com valores inferiores a 50 ng/mg de tecido seco, sem uso de nucleases. O conteúdo de colágeno foi mantido em M2 e apresentou aumento relativo em M1 após a descelularização. A histologia sugeriu maior preservação estrutural da MEC de M2, e a MEV evidenciou arcabouços porosos, com preservação dos componentes fibrosos e presença de incrustações mineralizadas em M2. Conclui-se que polpas suínas de dentes formados e em formação podem ser descelularizadas com sucesso por um protocolo pouco agressivo e que o estágio de desenvolvimento dentário influencia as características da MEC obtida, sendo a polpa do dente em formação (M2) uma fonte promissora de arcabouço para a regeneração pulpar.

Palavras-chave: matriz extracelular descelularizada; polpa dentária; engenharia tecidual; suínos; endodontia regenerativa.

ABSTRACT

Tissue decellularization yields extracellular matrix (ECM) scaffolds with potential application in tissue engineering and regenerative endodontic procedures. Porcine dental pulp, a material discarded by the food industry, remains an underexplored source for this purpose. The aim of this study was to decellularize porcine dental pulps from teeth at different stages of development and to determine which of them better preserves the structural characteristics of its ECM. Porcine hemi-arches were obtained from certified slaughterhouses, and pulps were collected from erupted permanent molars with fully formed roots (M1) and from developing intraosseous molars (M2). The pulps were subjected to a decellularization protocol using 0.1% EDTA and 10 mM Tris, followed by 0.1% SDS in 10 mM Tris, with intermediate PBS washes. Native and decellularized tissues were assessed by DNA quantification, collagen quantification using the hydroxyproline assay, fluorescence microscopy (DAPI), histological analysis (hematoxylin and eosin and Masson's trichrome) and scanning electron microscopy (SEM); tooth anatomy was evaluated by computed tomography. M2 pulp yielded a greater mass per tooth (1.168 g versus 0.377 g for M1). The protocol reduced DNA content by an average of 99% in both groups, with values below 50 ng/mg of dry tissue, without the use of nucleases. Collagen content was maintained in M2 and showed a relative increase in M1 after decellularization. Histology suggested greater structural preservation of the M2 ECM, and SEM revealed porous scaffolds with preserved fibrous components and mineralized deposits in M2. It is concluded that porcine pulps from fully formed and developing teeth can be successfully decellularized with a mild protocol and that the stage of tooth development influences the characteristics of the resulting ECM, with the developing tooth (M2) pulp emerging as a promising scaffold source for pulp regeneration.

Keywords: decellularized extracellular matrix; dental pulp; tissue engineering; swine; regenerative endodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma.....29
Figura 2 – Hemi-arcadas suínas e polpas coletadas.....30
Figura 3 – Peça cirúrgica recém preparada para coleta. Molar permanente superior.....31
Figura 4 – Cortes tomográficos realizados.....37
Figura 5 – Material pronto para ser emblocado e submetido para avaliação histológica.....38
Figura 6 – Quantificação de colágeno dos grupos experimentais.....39
Figura 7 – Quantificação de DNA dos grupos experimentais.....40
Figura 8 – Microscopia de fluorescência dos grupos experimentais - DAPI.....41
Figura 9 – Tecidos corados com HE.....42
Figura 10 – Tecidos corados pela técnica de Tricrômico de Masson.....43
Figura 11 – Tecidos avaliados em MEV.....44
Figura 12 – Grupo descelularizado M2 com destaques para as incrustações mineralizadas na estrutura de colágeno.....45
Figura 13 – Comparativo de tecidos corados pela técnica de HE.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cronologia de erupção dos dentes de suínos (SISSON, 1981).....22
Tabela 2 – Relação de peso in natura por tipo dentário.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem

°C: graus Celsius

µg/mL: micrograma por mililitro

Å: angstrom

cm: centímetro

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

g: grama

H&E: Hematoxilina e Eosina

kV: kilovolt

m²: metro quadrado

mA: Mili ampere

mg: miligrama

min: minuto(s)

mL: mililitro

mm: Milímetro

mM: milimolar

n: número

ng: nanogramas

nm: nanômetro

p/v: partes por volume

p: significância

pb: pares de base

PBS: Phosphate-buffered saline ou Solução salina tamponada com fosfato

pH: potencial hidrogeniônico

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Lauryl ou dodecilsulfato de sódio

Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano ou Cloridrato de trometamina, ou ainda TRIS HCl

v/v: volume por volume

x G: multiplicação pela aceleração gravitacional

µL: microlitro

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....15
2.1 Formação embrionária das polpas dentárias.....15
2.2 Constituintes das polpas dentárias humanas e suínas.....17
2.3 Matriz extracelular das polpas dentárias.....20
2.4 Aspectos dentários dos suínos.....21
2.5 Métodos para a descelularização.....23
2.6 Critérios de avaliação do processo de descelularização.....26
3 OBJETIVOS.....28
3.1 Objetivo geral.....28
3.2 Objetivos específicos.....28
4 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO.....29
4.1 Descelularização das polpas.....31
4.2 Quantificação de DNA.....32
4.3 Quantificação de colágeno.....32
4.4 Caracterização histológica.....33
4.5 Microscopia de fluorescência / DAPI.....34
4.6 Microscopia eletrônica de varredura.....34
4.7 Tomografia das peças.....35
5 RESULTADOS.....36
6 DISCUSSÃO.....47
7 CONCLUSÕES.....58
REFERÊNCIAS.....59
APÊNDICE A – Artigo publicado “Matriz extracelular de polpa dental suína descelularizada: comparação entre dentes formados e em formação”.....67

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas por novos materiais e técnicas são dependentes da compreensão e estudo de aspectos básicos de histologia. Buscar novas fontes de material bem como entender como os tecidos humanos e animais se correlacionam pode abrir portas para novas terapias e tratamentos, baseados em xenoimplantes. A utilização de células tronco se mostra promissora no tratamento de diversas doenças humanas (Adanir; Khurshid; Ratnayake, 2022). Em algumas situações, a aplicabilidade clínica dessas células se dá diretamente no local a ser tratado. Contudo, para a terapêutica de diversos casos se faz necessária a utilização de uma estrutura base ou arcabouço. Essa estrutura permite dar uma sustentação para que essas células se organizem, de maneira similar ao tecido almejado (Alksne; Kalvaityte; Simoliunas; Gendviliene et al., 2022). A manutenção de uma composição estrutural nativa é um requisito para técnicas tridimensionais de engenharia tecidua (Remaggi; Barbaro; Di Conza; Trevisi et al., 2022). O domínio dessa estrutura é almejado e buscado de diversas maneiras. Dentre essas, a descelularização tecidual é uma realidade. Partindo de um tecido existente, é possível remover as células deixando a matriz extracelular pronta para receber novas células: uma estrutura pronta, capaz de receber e abrigar tridimensionalmente essas células (Remaggi; Barbaro; Di Conza; Trevisi et al., 2022).

Esse arcabouço descelularizado apresenta reduzida possibilidade de rejeição tecidual do hospedeiro (Stern; Myers; Hammam; Stern et al., 2009). No que diz respeito à polpa dentária em geral, pouco foi estudado sobre essa descelularização (Bakhtiar, Hengameh; Rajabi, Sarah; Pezeshki-Modaress, Mohammad; Ellini, Mohammad Reza et al., 2021). Após um processo de descelularização bem sucedido, ocorre a geração de um arcabouço biológico de matriz extracelular, também citado abreviadamente como MEC. Esse arcabouço celular pode ser utilizado diretamente em medicina regenerativa com ou sem adição de células. Além disso, ele pode sofrer um processamento adicional para a confecção de hidrogéis e bio-tintas (Dzobo; Motaung; Adesida, 2019). Hoje em dia nós já temos disponível no mercado vários produtos feitos a partir de tecidos animais. Tecidos moles, tecidos ósseos e tecidos cardíacos se transformam na fonte de produtos diversos. Esses produtos podem, por exemplo, ajudar na reconstrução abdominal, mamária, reforçar tecidos moles do assoalho inguinal e reparo de hérnias na clínica médica (Adanir; Khurshid; Ratnayake,

2022) (Dzobo; Motaung; Adesida, 2019; Isaeva; Beketov; Arguchinskaya; Ivanov Scapital A et al., 2022). Uma ampla gama de abordagens de engenharia de biomateriais e tecidos tem sido usada para gerar alternativas potenciais que recriam características celulares alinhadas aos benefícios dos enxertos (Uygun; Soto-Gutierrez; Yagi; Izamis et al., 2010). Em particular, os hidrogéis feitos a partir de proteínas naturais ganharam interesse significativo devido às suas propriedades funcionais de matriz extracelular, (Sasaki; Matsumine; Watanabe; Yamato et al., 2015) biocompatibilidade inerente e adequação como portadores de diferentes tipos de células. (Paccola Mesquita; Hochman-Mendez; Morrissey; Sampaio et al., 2019; Trevizani; Leal; Floriano; Mancini et al., 2025) Estudada como fonte de células tronco, a polpa pode também ser arcabouço para engenharia tecidual e produção de hidrogéis de interesse terapêutico (Ding; Niu; Liu, 2015; Trevizani; Leal; Floriano; Mancini et al., 2025). Recentemente, uma terapia para recuperação de lesões neuronais baseada em aplicação de hidrogel de polilaminina foi anunciada (Coelho-Sampaio; Tenchov; Nascimento; Hochman-Mendez et al., 2020). A laminina, que é precursora da polilaminina, é um constituinte natural das polpas dentárias. (Yoshiba; Edanami; Ohkura; Maekawa et al., 2021)

Em Odontologia, quando ocorre um traumatismo do tecido pulpar antes da completa formação radicular, as técnicas convencionais de obturação ficam prejudicadas. O desenvolvimento em comprimento desse dente é interrompido, deixando uma estrutura de paredes finas e curta, o que prejudica a longevidade desse dente, bem como afeta a situação estética devido a uma alteração cromática. Para contornar essa situação, técnicas que visam revitalizar dentes têm sido descritas com sucesso na literatura (Fiore; Hartwell, 2017; Siddiqui; Sarkar; Kim; Kadincesme et al., 2021) Por essa razão, materiais que possam resultar em nova formação pulpar são desejáveis.

A polpa dentária suína é um material descartado e inutilizado até o presente momento. Há uma carência de matrizes de polpa dentária, ao passo que existem diversas matrizes oriundas de outros tecidos. Não há também, um padrão ouro de matrizes extracelulares. Entender a dinâmica biológica dessa polpa dentária descelularizada em dentes com diferentes graus de formação pode abrir caminho para que esse material seja eventualmente utilizado como um arcabouço terapêutico viável. Considerando a relevância dos estudos modernos com biomateriais, avaliaremos a

polpa de um dente molar permanente, e a compararemos com a polpa de um dente em formação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, tratamos dos elementos principais em que se baseou nosso estudo, levantando as leituras apropriadas para seis tópicos. Iniciamos com a formação embrionária das polpas dentárias, seguimos para os constituintes das polpas dentárias humanas e suínas. A seguir tratamos dos aspectos da matriz extracelular das polpas dentárias, avançamos para os aspectos dentários dos suínos, fazemos um levantamento dos métodos para a descelularização e, finalmente, apresentamos os critérios de avaliação do processo de descelularização.

2.1 Formação embrionária das polpas dentárias

Com origem embrionária diferenciada, a polpa tem sua origem em uma formação ectomesenquimal. Ectomesênquima é um mesênquima derivado das células das cristas neurais que migram para a cavidade oral (Nanci, 2013). Seu nome se deve ao fato de que essas células se originam do ectoderma, mas formam um tecido conjuntivo frouxo e estão localizadas no tecido derivado do mesoderma. Posteriormente ao desenvolvimento, o ectomesênquima originará estruturas mais especializadas dos dentes, como dentina, polpa dentária, cemento, ligamento perialveolar e osso alveolar (Thesleff, 2014).

Assim como nos humanos, suínos apresentam dentição difiodonte (decíduos e permanentes) sendo também classificados como bunodontes, (cúspides dos molares baixas e arredondadas). Isso é compatível com animais que fazem alimentação onívora. (Frandson; Wilke; Fails, 2011)

Devido às semelhanças morfológicas, histológicas e moleculares com a dentição humana, o suíno tem sido amplamente utilizado como modelo experimental em estudos de desenvolvimento dentário, engenharia tecidual e regeneração pulpar. (Yue; Xu; Kan; Zhao et al., 2021) O desenvolvimento dentário nessa espécie ocorre durante o período embrionário e fetal, sendo classificado em estágios morfológicos progressivos: lâmina dentária, botão, capuz e sino. (Junqueira; Carneiro; Contopoulos)

Em suínos, a odontogênese inicia-se aproximadamente entre o 30º e o 35º dia de gestação, a partir do espessamento do epitélio oral embrionário, de origem ectodérmica (Frandson; Wilke; Fails, 2011). Esse espessamento dá origem à lâmina dentária primária, que se estende ao longo dos futuros arcos dentários. A lâmina dentária é responsável pela formação dos germes dentários dos dentes decíduos e, posteriormente, pela lâmina sucessional associada aos dentes permanentes. O ectomesênquima subjacente, derivado das células da crista neural, desempenha papel essencial na indução e progressão do desenvolvimento dentário. (Yue; Xu; Kan; Zhao et al., 2021)

O estágio de botão é caracterizado pela proliferação ativa das células epiteliais da lâmina dentária em direção ao ectomesênquima subjacente, resultando na formação do botão dentário. (Junqueira; Carneiro; Contopoulos) Histologicamente, observa-se um aglomerado celular epitelial arredondado, composto por células indiferenciadas com elevada atividade mitótica. Nessa fase, ainda não há definição morfológica do dente, e a papila dentária encontra-se pouco delimitada. Em suínos, essa fase apresenta intensa atividade proliferativa, especialmente nos germes destinados à formação de pré-molares e molares (Nanci, 2013).

O estágio de capuz é marcado pela invaginação do botão dentário, formando o órgão do esmalte. Nesse momento, ocorre a diferenciação de três componentes fundamentais do germe dentário: o órgão do esmalte, a papila dentária e o folículo dentário (Nanci, 2013). O órgão do esmalte passa a apresentar organização celular inicial, com distinção entre epitélio externo do esmalte, epitélio interno do esmalte e retículo estrelado. Em suínos, observa-se um órgão do esmalte relativamente volumoso, especialmente nos germes de dentes posteriores, refletindo a futura complexidade coronária (Nanci, 2013), (Frandson; Wilke; Fails, 2011; Junqueira; Carneiro; Contopoulos).

O estágio de sino representa uma fase avançada de diferenciação e especialização tecidual, na qual ocorre a definição da forma da coroa dentária. O órgão do esmalte apresenta completa organização histológica, sendo composto por epitélio externo do esmalte, epitélio interno do esmalte, retículo estrelado e estrato intermediário (Junqueira; Carneiro; Contopoulos). Este último encontra-se particularmente bem desenvolvido em suínos (Sova; Tjäderhane; Heikkilä; Jernvall) e

está intimamente relacionado à futura atividade secretora dos ameloblastos. Durante essa fase, ocorre a histodiferenciação celular: as células do epitélio interno do esmalte diferenciam-se em pré-ameloblastos, enquanto as células periféricas da papila dentária diferenciam-se em pré-odontoblastos. O ectomesênquima subjacente ao epitélio interno do esmalte se diferencia e dá origem à papila dentária, que posteriormente se transforma na polpa dentária. Observa-se intensa polarização celular, com reorganização nuclear e citoplasmática, preparando o início da dentinogênese e, subsequentemente, da amelogênese. Concomitantemente, a morfodiferenciação determina o contorno da coroa e o padrão bunodonte característico da espécie suína (Junqueira; Carneiro; Contopoulos; Nanci, 2013).

2.2 Constituintes das polpas dentárias humanas e suínas

Os dentes de mamíferos, apesar de terem variações anatômicas inerentes à espécie, possuem uma constituição estrutural similar. Todos possuem uma superfície externa de esmalte na parte coronária, com uma camada intermediária de dentina (Frandson; Wilke; Fails, 2011). Na parte radicular, as raízes são desprovidas de esmalte, sendo formadas essencialmente de dentina revestida externamente por cemento. Residindo no interior de todas essas estruturas mineralizadas, fica a polpa dentária (Frandson; Wilke; Fails, 2011; Thesleff, 2014).

A polpa dentária desempenha um papel importante na formação e manutenção da dentina, bem como na defesa contra infecções dentárias. Ela possui uma rica rede de microcirculação sanguínea e de estruturas nervosas (Thesleff, 2014). O percentual de volume pulpar ocupado por vasos corresponde a 14%. Com isso, a polpa é o tecido oral com maior quantidade de fluxo sanguíneo por unidade de peso (Lopes; Siqueira, 2015). A matriz extracelular da polpa é produzida principalmente por fibroblastos e consiste em proteínas colagenosas e não colagenosas. Colágenos tipos 1 e 3 constituem a maioria do total de colágeno tecidual (Linde, 1995). Ao contrário dos vasos linfáticos em outros tecidos, os vasos linfáticos na polpa dentária não são cercados por fibras elásticas do tecido conjuntivo circundante; apenas algumas fibras de ancoragem estão presentes. Portanto, os vasos linfáticos são conectados diretamente às fibras de colágeno circundantes, forçando-os a resistir à pressão intracelular e permanecer abertos (Oehmke; Knolle; Oehmke, 2003). As proteínas não colagenosas incluem laminina, fibronectina, tenascina e proteoglicanas (Paccola

Mesquita; Hochman-Mendez; Morrissey; Sampaio et al., 2019). Por causa da alta celularidade, a polpa dental possui dez a quinze por cento de sua massa seca composta por lipídeos (Lopes; Siqueira, 2015). Os componentes básicos da Matriz extra-celular constituem fibras de colágeno, microfibrilas, elastina. Destaca-se também proteínas de contato como fibronectina, laminina, proteoglicanos, e glicosaminoglicanos que são responsáveis pela retenção de água no tecido. Existem ainda, as enzimas de reciclagem da Matriz (Iwasa; Marshall, 2020).

Lopes e Siqueira (2015) definem a polpa dentária humana como um tecido conjuntivo frouxo, encontrado dentro dos canais radiculares do dente ou dentro da cavidade pulpar, que contém vascularização, fibras nervosas, células e vasos linfáticos em grandes quantidades. Dentre as células, temos, em grande número, odontoblastos, fibroblastos, células imunes, células-tronco e células epiteliais. Os odontoblastos são as células responsáveis pela formação da dentina (Junqueira; Carneiro; Contopoulos). Eles são encontrados na superfície externa da polpa dentária e produzem túbulos dentinários que se estendem através da dentina. Os fibroblastos são células responsáveis pela produção da matriz extracelular da polpa dentária (Paccola Mesquita; Hochman-Mendez; Morrissey; Sampaio et al., 2019; Junqueira; Carneiro; Contopoulos). Eles são encontrados em toda a polpa dentária, incluindo a periferia e o centro. As células imunes são responsáveis pela defesa da polpa dentária contra infecções. Elas são encontradas em toda a polpa dentária, mas são mais abundantes na periferia (Nanci, 2013). As células epiteliais são encontradas na superfície externa da polpa dentária. Elas são responsáveis pela proteção da polpa dentária contra danos. A matriz extracelular da polpa dentária é composta por colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Osago; Kobayashi-Miura; Hamasaki; Hara et al., 2018). Ela fornece suporte e nutrição para as células da polpa dentária. Ela é bem vascularizada, o que fornece nutrientes e oxigênio para as células. A inervação também presente permite que ela responda a estímulos externos, gerando tanto sensibilidade térmica quanto proprioceptiva (Lopes; Siqueira, 2015; Osago; Kobayashi-Miura; Hamasaki; Hara et al., 2018).

Todos esses constituintes vão variar de tecido a tecido para que atendam a suas especificidades funcionais. Por essa razão, os arcabouços biológicos têm matrizes extracelulares com composição e propriedades biomecânicas singulares (Brown; Barnes; Kasick; Michel et al., 2010). Devido a suas particularidades, cada tipo

de material utilizado para a descelularização deve utilizar um protocolo ajustado de forma específica, dependendo da complexidade do tecido (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011).

Já foi descrito que essas matrizes extracelulares influenciam na mitogênese, quimiotaxia e diferenciação celular. (Allen; Seltz; Jiang; Kasick et al., 2010; Barkan; Green; Chambers, 2010; Cortiella; Niles; Cantu; Brettler et al., 2010). O controle dessas caracteristicas são importantes para todo trabalho com biotecnologia envolvida. Além disso, essas estruturas fornecem um microambiente igual ou semelhante a matriz nativa (Gilbert; Sellaro; Badylak, 2006).

Poucas informações são relatadas a respeito da quantificação específica de componentes bioquímicos e análise estrutural da polpa dentária suína. Em geral, se assume que há uma correspondência grande entre as estruturas suínas e humanas, com alterações morfológicas inerentes a cada espécie (Garcia-Arranz; Villarejo-Campos; Barambio; Garcia Gomez-Heras et al., 2022). Eftekhar, Lee, Salamati e Liu (2022) afirmam que humanos e suínos compartilham 97,8% de correspondência em DNA.

A descelularização pulpar suína pode oferecer um arcabouço de constituição estrutural muito similar ao tecido que desejamos obter após o procedimento de revitalização. Os porcinos possuem características genéticas e fisiológicas semelhantes aos humanos, o que os torna um dos modelos animais mais úteis e versáteis (Garcia-Arranz; Villarejo-Campos; Barambio; Garcia Gomez-Heras et al., 2022). Devido a essas semelhanças, os dados gerados a partir de modelos suínos são mais propensos a levar a tratamentos humanos viáveis do que aqueles realizados em murinos (Schook; Collares; Darfour-Oduro; De et al., 2015). Mohd Noor; Lam; Lim; Lau et al. (2026) trabalharam com polpas dentárias de cães beagle para descelularizar e recelularizar polpas. A polpa dentária suína pode eventualmente ser um modelo de estudo para evitar a necessidade de realizar esses estudos em cães. No entanto, os caninos diferem substancialmente dos humanos, e questões éticas surgem de seu envolvimento (Mangione, 2022).

2.3 Matriz extracelular das polpas dentárias

A matriz extracelular (MEC) que permanece após o processo de decelularização contém os componentes de um microambiente tecidual específico que não é possível criar sinteticamente. Agmon; Christman, 2016; (Hargreaves; Giesler; Henry; Wang, (2008) estabeleceram três componentes importantes para a engenharia tecidual. O primeiro componente da engenharia de tecidos destacado por eles seria uma fonte celular. Nesse aspecto, a polpa dentária já é reconhecida como importante fonte de células para culturas e diferenciações celulares ocorridas a partir das células tronco que esse tecido abriga (Weiss; Gonçalves; Maranduba; de Resende, 2020).

O segundo componente da engenharia de tecidos é um arcabouço físico. Os tecidos são estruturas tridimensionais e um arcabouço apropriado é necessário para promover o crescimento e a diferenciação celular. Hargreaves; Giesler; Henry; Wang (2008) informam que moléculas de matriz extracelular controlam a diferenciação de células-tronco, e um arcabouço apropriado pode se ligar seletivamente e localizar células contendo fatores de crescimento. Ainda segundo eles, terceiro componente da engenharia de tecidos a ser considerado são as moléculas de sinalização. Tanto os fatores de crescimento quanto outros compostos são capazes de estimular a proliferação celular e direcionar a diferenciação celular.

Um outro tipo de arcabouço é o coágulo sanguíneo. Trata-se de um tipo de arcabouço autólogo, que é rico em fatores de crescimento. O sangramento induzido no interior de um elemento dentário tem a vantagem adicional de conter glicoproteína adesiva, que pode reagir com receptores celulares e facilitar a fixação celular ao arcabouço (Altaii; Kaidonis; Koblar; Cathro, 2017). Essa Glicoproteína, a vitronectina, também está presente como componente natural da polpa dentária. Contudo, ao se utilizar o coágulo sanguíneo, os Eritrócitos presentes podem vir a necrosar e atrapalhar a regeneração tecidual.

O PRP também possui vantagens em relação ao coágulo sanguíneo ao não ter a presença de eritrócitos. Sendo desprovido de células, a matriz descelularizada, teria em tese, a vantagem da glicoproteína, sem o risco de necrose tecidual. Essa forma de arcabouço tem sido proposta e usada com sucesso (Altaii; Kaidonis; Koblar; Cathro et al., 2017). Entretanto os métodos de preparação de PRP propostos por pesquisas in

vitro anteriores e estudos em animais envolvem muitas etapas de centrifugação do sangue e também podem incluir ciclos de congelamento-descongelamento para aumentar a concentração de plaquetas e fatores de crescimento. Estes métodos são atualmente demasiadamente complicados para uma utilização clínica eficaz segundo Siddiqui, Sarkar; Kim; Kadincesme et al., 2021).

Traphagen; Fourligas; Xylas; Sengupta et al., (2012) descreveram métodos para descelularizar e desmineralizar efetivamente os germes dentários molares suínos, preservando os gradientes naturais de proteína ECM. A composição natural da ECM dentária foi avaliada por meio de análises histológicas e imuno-histoquímicas (IHQ) de proteínas fibrilares e da membrana basal. Seus resultados mostraram que gradientes de colágeno I, fibronectina, colágeno IV e laminina foram detectados nos tecidos dentários in natura e mantidos em amostras descelularizadas. O colágeno é um importante componente estrutural. É formado pela polimerização de tropocolágeno (unidades moleculares alongadas) consistindo em 3 subunidades dispostas em tríplice hélice). Essa estrutura permite a rigidez, elasticidade e força de tensões variáveis. Todos os aminoácidos dessa proteína possuem uma sequência repetitiva denominada a [Gly X-Y] n, sendo o X comumente ocupado pela prolina (Pro) e o Y ocupado pela hidroxiprolina (Hyp) (Collin; Grad; Zeugolis; Vinatier et al., 2011); (Junqueira; Carneiro, 2015)

2.4 Aspectos dentários dos suínos

A anatomia dentária dos suínos apresenta um total de 44 dentes, distribuídos entre 3 incisivos, 1 canino, 4 pré molares e 3 molares, tanto em mandíbula quanto em maxila. Os dentes posteriores, molares e pré molares são conhecidos como dentes bunodontes, por apresentarem estrutura com duas cúspides afiladadas e centralizadas. (Ikeda, 1979).

Tabela 1 – Cronologia de erupção dos dentes de suínos (SISSON, 1981)

Dentes	Erupção	Muda
I1	2 a 4 semanas	12 meses
I2	superior, 2 a 3 meses inferior, 1 1/5 a 2 meses	16 a 20 meses
I3	antes do nascimento	8 a 10 meses
C	antes do nascimento	9 a 10 meses
P1	5 meses	
P2	5 a 7 semanas	12 a 15 meses
P3	superior, 4 a 8 dias inferior, 2 a 4 semanas	12 a 15 meses
P4	superior, 4 a 8 dias inferior, 2 a 4 semanas	12 a 15 meses
M1	4 a 6 meses	
M2	8 a 12 meses	
M3	18 a 20 meses	

Fonte: Dados obtidos no trabalho de Getty (1986)

A espécie Sus scrofa é extremamente diversa, compreendendo desde o javali selvagem até o porco doméstico. Estima-se que existam entre 16 e 17 subespécies diferentes, que variam conforme a localização geográfica e o grau de domesticação ou cruzamento. (Deberdt; Scherer, 2007). O suíno doméstico de produção Sus scrofa domesticus foi a subespécie avaliada na cronologia de erupção dentária proposta por Getty (1986). Com isso, apenas raças europeias/ocidentais padrão não selvagem foram incluídas, deixando de fora o javali selvagem (Sus scrofa scrofa), minipigs experimentais e linhagens específicas mais modernas.

Ide, Yoshiaki; Nakahara, Taka; Nasu, Masanori; Matsunaga e Satoru (2013) realizou levantamento tomográfico que foi desenvolvido em um cruzamento do porco miniatura da linhagem Göttingen e do porco miniatura da linhagem Ohmini, e o cruzamento F1 do porco da linhagem Landrace e do porco da linhagem Great Yorkshire. Nesse estudo, os molares m1 iniciam a formação coronária entre 4 a 6 meses de idade, e a formação radicular, entre 9 e 17 semanas. A erupção bucal ocorre após o mês 17. Já no caso do molar M2, a formação coronária se dá entre 9 meses e

17 meses. Comparando com porcos domésticos, os minipigs tendem a ter erupção dentária mais breve. Por sua vez, javalis selvagens tem erupção mais retardada. Isso se explica pelas seleções genéticas realizadas para que as linhagens atendam a objetivos específicos de crescimento e engorda que cada um (Frandson; Wilke; Fails, 2011; Manual, 2020). Segundo Sova; Tjäderhane; Heikkilä; Jernvall, quando comparados aos molares humanos, os molares de porco se desenvolvem consideravelmente mais rápido, Não foram encontrados trabalhos que descrevem as possíveis variações de cronologia, considerando as diversas linhagens genéticas e cruzamentos genéticos possíveis. As mais usadas hoje se derivam de raças europeias, sendo as principais: Large White (Yorkshire), Landrace, Duroc, Pietrain, e Hampshire. (Deberdt; Scherer, 2007; Manual, 2020).

2.5 Métodos para a descelularização

Para a utilização de órgãos inteiros, técnicas de edição genética CRISPR-Cas9 e transposon estão em amplo estudo, gerando suínos modificados para aumentarem a compatibilidade com humanos (Yue; Xu; Kan; Zhao et al., 2021). No entanto, para diversos casos, a remoção do conteúdo celular e a aplicação da matriz extracelular é a técnica a ser aplicada diante da dificuldade de obtenção de tecidos integralmente compatíveis oriundos de animais geneticamente modificados (Yuan, Yang, Wang, Chen et al., 2023; Yue, Xu, Kan, Zhao et al., 2021).

A descelularização pode ser realizada no sistema cell sheet (lâmina celular), em fragmentos de tecidos, e em órgãos inteiros. Recentemente foi descrita na literatura a descelularização a partir de órgãos complexos através de perfusão desses órgãos inteiros. O mesmo procedimento já foi descrito para partes do intestino, fígado, pulmão, coração e pâncreas (Sullivan; Mirmalek-Sani; Deegan; Baptista et al., 2012; Candiello; Cole; Halfter, 2010). Tecidos vegetais também têm sido estudados como possíveis fontes de matriz extracelular com posterior repopulação celular (Agmon; Christman, 2016).

A literatura descreve vários métodos para a descelularização. Esses métodos vão utilizar agentes físicos, químicos, biológicos ou, até mesmo, a combinação destes agentes (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011). No procedimento de descelularização, substâncias como Tris, PBS, SDS e EDTA são utilizadas em conjunto para remover as

células de um tecido, preservando sua matriz extracelular (MEC).(Remaggi; Barbaro; Di Conza; Trevisi et al., 2022) O Tris atua como tampão, estabilizando o pH durante o processo; o PBS mantém a osmolaridade e auxilia na lavagem dos resíduos celulares; o SDS, um detergente potente, rompe as membranas celulares e solubiliza proteínas; e o EDTA é quelante de íons divalentes, inibindo enzimas que poderiam degradar a MEC. (Gilpin; Yang, 2017). Essa combinação permite a obtenção de um arcabouço acelular. Dentre os agentes físicos mais comuns utilizados podemos citar a temperatura, a força/pressão e a eletroporação. Já os agentes químicos mais utilizados incluem as soluções hipotônicas, soluções hipertônicas e detergentes (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011). Dentre os principais detergentes utilizados, nós temos, por exemplo, o SDS, o DOC, o Triton x-100 e o CHAPS (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011)

Existe ainda, a possibilidade de uso de agentes biológicos, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Os principais agentes enzimáticos utilizados são a tripsina, a dispase e a nucleasse. Já os agentes não enzimáticos principais são os quelantes e toxinas. Além disso nós podemos utilizar a combinação desses agentes para garantimos uma máxima na máxima remoção de células (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011; Remaggi; Barbaro; Di Conza; Trevisi et al., 2022)).

O processo de remodelação do hospedeiro de um arcabouço de origem biológica depende dos eventos imediatos e subsequentes que ocorrem na superfície do material após a implantação in vivo.(Balic; Perver; Pagella; Rehrauer et al., 2023; Elnawam; Abdallah; Nouh; Khalil et al., 2024). A topografia da superfície determinará as moléculas hospedeiras que se ligam e o tipo e comportamento das células que medeiam a resposta do hospedeiro. A produção de arcabouços biológicos compostos de MEC requer o uso de métodos de processamento que descelularizam e esterilizam terminalmente o material (Balic; Perver; Pagella; Rehrauer et al., 2023; Elnawam; Abdallah; Nouh; Khalil et al., 2024; Stern; Myers; Hammam; Stern et al., 2009). Esses métodos podem afetar a composição, ultraestrutura, propriedades mecânicas e topografia da superfície afetando assim a resposta do hospedeiro associada ao seu uso.(Balic; Perver; Pagella; Rehrauer et al., 2023; Elnawam; Abdallah; Nouh; Khalil et al., 2024; Hu; Gao; Xu; Zhu et al., 2017)

Assim, compreender as mudanças ultra estruturais ocorridas após a descelularização pode nortear a escolha do material, bem como o deixar melhor indicado para algum ensaio clínico futuro. (Traphagen; Fourligas; Xylas; Sengupta et al., 2012). Se um órgão inteiro não for necessário para um estudo, então folhas finas do órgão descelularizado podem ser usadas como um método mais conveniente para testar o efeito da MEC nas células, mantendo ainda a arquitetura e a composição bioquímica do tecido. (Wolf; Daly; Brennan-Pierce; Johnson et al., 2012). As duas principais abordagens para criar essas fatias são primeiro descelularizar o órgão inteiro e depois cortá-lo em fatias ou fazer o oposto, seccionando o órgão não processado e depois descelularizando as fatias. Para seccionar o órgão após a descelularização, o órgão deve primeiro ser enrijecido por meio da incorporação do órgão em agarose, meio de congelamento OCT ou parafina (Uygun; Soto-Gutierrez; Yagi; Izamis et al., 2010). Entretanto, a abordagem mais comum para criar seções descelularizadas é primeiro cortar o tecido na espessura desejada e então descelularizar as fatias de tecido. Essa abordagem tem sido usada para tendões, cérebro, rins, pulmões, fígado, estroma da córnea e derme (Gilpin; Yang, 2017; Gorschewsky; Klakow; Riechert; Pitzl et al., 2005). Materiais descelularizados também podem ser criados com tamanhos entre a descelularização de órgãos inteiros e fatias finas, por exemplo, cubos de osso de 4 × 4 × 3 mm ou pedaços de tecido musculofascial de 4 × 2 × 0,5 cm. (Gorschewsky; Klakow; Riechert; Pitzl et al., 2005; Uygun; Soto-Gutierrez; Yagi; Izamis et al., 2010).

Para a descelularização de uma polpa dental suína, Yuan, Yang, Wang, Chen et al., (2023) concluíram que um tratamento por 12 horas em EDTA, seguido dos demais reagentes foi um tempo considerado ideal, já que tratamentos mais curtos (6 horas) deixaram resíduos nucleares, enquanto tempos mais longos (18 horas) comprometeram a estrutura da ECM. A sequência usada por esse autor foi a seguinte: os tecidos pulpares foram excisados dos germes dos incisivos permanentes e cortados em tiras, enxaguados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril 3 vezes, seguido três de enxágues com água bidestilada. As amostras foram primeiramente tratadas com 0,02% de tripsina e 0,05% EDTA a 37 C por 12 h e, seguido por 2% de Triton X-100 a 4 C por 3h e finalmente tratada com 0,02 mg/mL de DNase I a 37 C por 24h.

Métodos enzimáticos podem ser interessantes, mas têm suas peculiaridades. Crapo, Gilbert e Badylak (2011) descrevem os agentes enzimáticos úteis para a remoção de células de tecidos. As nucleases, como a DNase e RNase, fragmentam os ácidos nucleicos, facilitando a eliminação de resíduos celulares. Proteases como a tripsina e dispase, que degradam proteínas celulares, auxiliando na remoção eficiente das células sem danificar excessivamente a matriz. A colagenase é usada para degradar colágeno em tecidos mais densos, permitindo uma melhor liberação de células. Já as lipases, são aplicadas para eliminar lipídios, tornando a matriz mais limpa e adequada para reutilização (Elnawam; Abdallah; Nouh; Khalil et al., 2024).

Contudo, alguns problemas potenciais são descritos. Apesar de serem eficazes, essas enzimas podem gerar desafios, incluindo degradação excessiva da matriz extracelular, afetando proteínas essenciais como colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, que são importantes para a integridade estrutural e bioatividade da ECM (Wolf; Daly; Brennan-Pierce; Johnson et al., 2012). Resíduos enzimáticos podem causar reações adversas, dificultando a recelularização do tecido após a descelularização. O tempo prolongado de exposição pode comprometer a funcionalidade da ECM, impactando proteínas como sulfato de heparano (glicosaminoglicano) e sulfato de condroitina, essenciais para sinalização celular e interação com células do hospedeiro (UHL; Zhang; Pouliot; Uriarte et al., 2020).

2.6 Critérios de avaliação do processo de descelularização

O intuito da descelularização é remover os componentes celulares imunogênicos e preservar a ultra estrutura nativa da Matriz extra-celular. Alguns autores, entre eles Agmon e Christman (2016); Crapo, Gilbert e Badylak (2011) sugeriram parâmetros para avaliar se o material descelularizado deve ou não conter para se garantir que o procedimento foi eficiente. Dessa maneira, ele não deve conter mais do que 50 (cinquenta) ng de DNA dupla fita por micrograma de peso seco do material. Os fragmentos de DNA encontrados não devem ter mais do que 200 (duzentos) pares de base e nenhum material nuclear deve ser visível (Agmon; Christman, 2016; Crapo; Gilbert; Badylak, 2011; Hillebrandt; Everwien; Haep; Keshi *et al.*, 2019). Baseando-se nisso, a literatura cita a quantificação de DNA do arcabouço gerado, assim com a coloração desse material. Várias colorações são descritas na literatura. As principais são a coloração de hematoxilina e eosina, alcian blue,

tricromico de masson, e vermelho de pricrosirius ; Widbiller; Rothmaier; Saliter; Wolflick *et al.*, 2021). A utilização de técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência e a utilização de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão ajudam na avaliação da integridade vascular (Goh; Bertera; Olsen; Candiello *et al.*, 2013, Mirmalek-Sani; Orlando; Mcquilling; Pareta *et al.*, 2013). E, além disso, dependendo da utilização desse arcabouço, é importante manter as propriedades biomecânicas deste tecido (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011; Gilpin; Yang, 2017).

Apesar de o processo de descelularização remover a níveis seguros todo o conteúdo celular e microbiológico, a literatura recomenda a esterilização desses arcabouços antes da sua utilização, seja ela *in vitro* ou *in vivo*. A utilização de ácidos (Hodde; Janis; Ernst; Zopf *et. al.*, 2007), utilização de solventes (Gorschewsky; Klakow; Riechert; Pitzl *et al.*, 2005), exposição a óxido de etileno (Rosario; Reilly; Ali Salah; Glover *et al.*, 2008), radiação por feixe de elétrons (Sun; Leung, 2008), e exposição à radiação Gama são processos recomendados. Mas os autores em geral têm uma ressalva quanto a esses métodos, explicando que eles acabam causando alguma alteração na ultra-estrutura desse arcabouço (Bernhardt; Wehrl; Paul; Hochmuth *et al.*, 2015). Recentemente tem-se falado em exposição ao dióxido de carbono supercrítico (Bernhardt; Wehrl; Paul; Hochmuth *et al.*, 2015). Essa técnica tem se mostrado bastante eficaz para a esterilização e até o momento não demonstrou provocar nenhum dano ou alteração na estrutura da Matriz extra-celular. Assim, no presente estado das pesquisas, esse seria o método de escolha para esterilização desses arcabouços.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo primário descelularizar polpas dentárias suínas de dentes em diferentes graus de formação para observar se algum desses preserva melhor as características estruturais de sua MEC.

3.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar o tecido in natura e descelularizado no nível histológico.

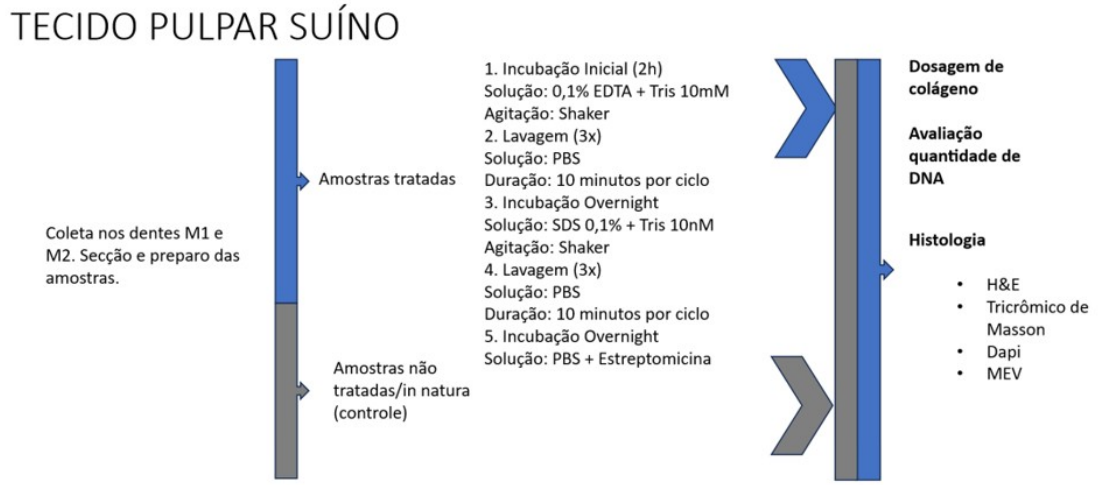
b) Avaliar o conteúdo de material genético (DNA) de amostras in naturas e descelularizadas.

c) Quantificar o colágeno presente nas amostras tratadas e não tratadas.

d) Padronizar um protocolo de descelularização para as amostras de tecidos pulpares.

4 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

Figura 1 – Organograma

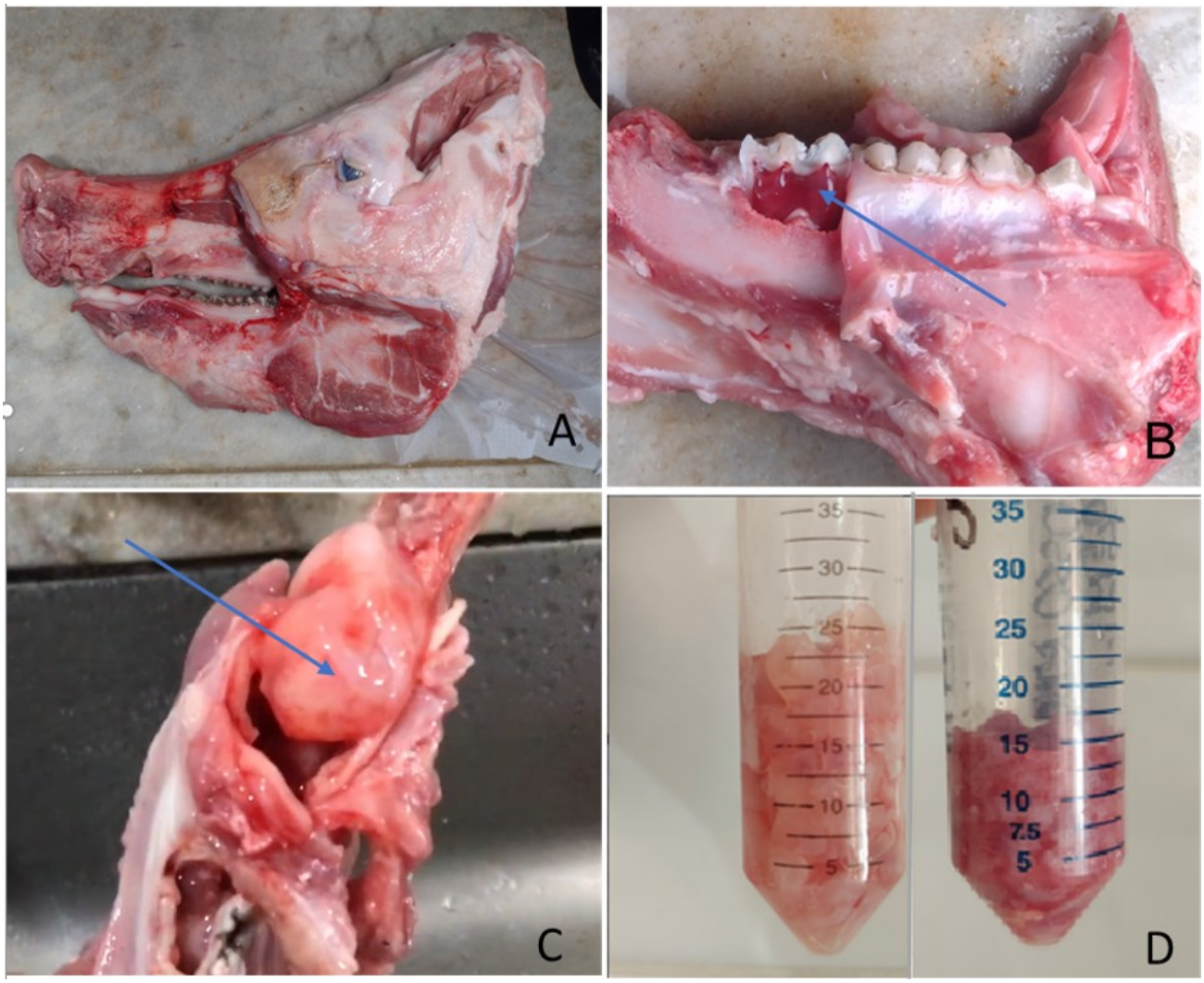


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Hemi-arcadas dentárias suínas foram obtidas frescas em abatedouros certificados na cidade de Juiz de Fora/MG. Considerando que esse material de origem animal é descartado, e o animal é abatido dentro das normas sanitárias vigentes (já que ele produz carne para consumo humano), um parecer de comitê de ética na pesquisa não se faz necessário. Durante o processamento, o animal é dividido ao meio no sentido craniocaudal, o que deixa a parte do crânio dividida ao meio, deixando de cada lado um globo ocular, metade de uma maxila e metade de uma mandíbula, ainda ligadas pelo masseter e pela articulação temporomandibular (Figura 2A). De posse desse material, a hemimandíbula é desarticulada da maxila para dar acesso aos dentes, já que sem essa etapa, o acesso à face oclusal dos elementos ficaria muito reduzido. Os dentes, ainda inseridos nas peças anatômicas, foram seccionados, no sentido mésio distal, com um disco de carborundum (Dentorium – International – NY – USA), acionado por peça reta em motor elétrico de bancada (Marathon). A polpa não foi cortada pelo disco. Após esse corte a coroa foi desprendida da porção radicular com auxílio de uma alavanca reta, deixando toda a polpa coronária exposta. A coleta pulpar foi realizada cuidadosamente com uso de pinças e curetas cirúrgicas. Com isso, polpas de molares M1 foram coletadas tanto em maxila quanto mandíbula. Para a obtenção dos dentes em formação na posição M2 dos suínos, foi necessário quebrar o

osso com uso de fórceps e cinzel, para expor os dentes que se formavam nas maxilas e mandíbulas. O material obtido foi prontamente lavado em soro fisiológico gelado, acondicionado em tubos falcon de 50ML (cinquenta mililitros) e congelados em freezer comum. Os exemplares foram colhidos aleatoriamente de diferentes animais, o que garante uma variabilidade genética dos espécimes. Dois grupos distintos foram estabelecidos, sendo um deles formado pelas polpas colhidas de molares permanentes suínos erupcionados, posição anatômica M1, que são dentes com estrutura radicular formada. O outro, formado pelas polpas colhidas de molares suínos ainda em formação, impactados no osso (posição anatômica M2).

Figura 2 – Hemi-arcadas suínas e polpas coletadas



A: hemi-arcadas frescas.

B: destaque para a polpa exposta de dente suíno M1 formado.

C: destaque para a polpa exposta em dente M2 suíno.

D: Polpas coletadas em tubos Falcon 50ml.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 3 – Peça cirúrgica recém preparada para coleta. Molar permanente superior



Polpa ainda na peça cirúrgica recém preparada para coleta. Molar permanente superior ainda em formação, intraósseo, posição M2 da anatomia suína.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.1 Descelularização das polpas

Polpas dentárias de 12 suínos foram isoladas para descelularização. O protocolo de descelularização utilizado inicia-se com uma incubação de 2 horas em solução de EDTA 0,1% associada a Tris 10 mM, sob agitação em shaker. O EDTA atua como agente quelante, promovendo a desestabilização de junções celulares dependentes de cálcio e magnésio, enquanto o Tris mantém o pH estável, favorecendo a preparação do tecido para etapas subsequentes. Em seguida, são realizadas três lavagens em PBS por 10 minutos cada, visando remover resíduos da solução inicial e equilibrar o meio. A etapa seguinte consistiu em uma incubação overnight em SDS 0,1% com Tris 10 mM, também sob agitação, onde o SDS, um detergente aniônico, promove lise celular e solubilização de membranas. Após nova série de lavagens em PBS (3×10 min), o tecido é mantido overnight em PBS suplementado com estreptomicina, medida que contribui para evitar contaminações bacterianas durante o processo.

4.2 Quantificação de DNA

Para a extração do DNA, em aproximadamente 50,0 mg (peso seco) de cada grupo experimental (n=3) foram adicionados 700,0 µL de solução de lise [Tris-HCl 10mM (p/v), EDTA 0,1M (p/v) e SDS 0,1% (p/v), pH 8,0] e três beads de cerâmica em cada eppendorf.

As amostras foram submetidas à maceração em Tissue Lyser II (Qiagen) com 4 ciclos de frequência 30/s cada. Em seguida, foram adicionados 20 µL de proteinase K (10,0 mg/mL; Thermo Fisher Scientific) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C overnight. Para a remoção das proteínas, foi adicionado 1,0 volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Alphatec) (25:24:1) (m/m/m), seguido de centrifugação (Thermo Scientific Megafuge 16R, EUA) a 12.000 x G por dez minutos. Na fase aquosa foi adicionado 0,5 volume de acetato de amônio (Vetec) 7,5M (p/v) e 2,0 volumes de etanol absoluto (Nox Lab solutions) gelado e incubado a -20°C overnight. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x G por 15 minutos. Em seguida, o pellet de DNA foi 32 lavado com 700 µL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugado a 1700 xG por 2 minutos (essa etapa foi feita duas vezes). O sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi seco à temperatura ambiente por no máximo 10 minutos. O pellet de DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris HCL 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0). A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Sigma) 1% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x utilizando o marcador de massa lambda (100 pb; Invitrogen). A eletroforese foi realizada em corrente constante de 80 mA por aproximadamente 50 minutos. A quantidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria com o uso do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) no comprimento de onda de 260/280nm.

4.3 Quantificação de colágeno

A quantidade de colágeno presente em cada grupo experimental (n=3) foi determinada por análise de hidroxiprolina segundo protocolo de Osago; Kobayashi-Miura; Hamasaki; Hara, (2018) modificado, onde 10 mg de amostra (peso seco) foi hidrolisado em 1 mL de HCl 9N (v/v) a 100°C por 15 horas para liberação de hidroxiprolina. Posteriormente, em 10 µL de amostra hidrolisada foram adicionados 200 µL de solução de cloroamina T [cloroamina T (Neon) 1,4% (p/v), isopropanol 10%

(v/v) e acetato de sódio (Proquimio) 0,5M (p/v)] e deixados à temperatura ambiente por 25 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de reagente de Ehrlich [p DAB 1M (p/v) em isopropanol 70% (v/v) e ácido perclórico (Merck) 20% (v/v)] e incubado a 65°C por 20 minutos. A absorbância foi lida no espectrofotômetro a 550 nm e o conteúdo de colágeno foi calculado sabendo que hidroxiprolina corresponde a 14,3% (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019). Uma curva padrão foi construída usando concentrações conhecidas de hidroxiprolina (Sigma) de 0 – 10 µg/mL.

4.4 Caracterização histológica

Devido à necessidade de entender as diferenças estruturais dos tecidos antes e depois de serem processados, realizamos um estudo histológico com os corantes HE, Tricrômico de Massom, e Dapi.

Os tecidos analisados foram emblocados em parafina e seccionados em plano frontal, obtendo-se secções seriadas de 3µm. As secções histológicas foram selecionadas em 3 diferentes profundidades de cortes seriados para as análises morfométricas. Para a coloração, as lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol por 20 minutos cada, com posterior hidratação em álcool seriado em ordem decrescente (100%, 90%, 80% e 70% por 2 minutos cada banho) e imersão em água por 20 minutos.

Para a descrição qualitativa dos cortes histológicos, as lâminas foram inicialmente desparafinizadas em xilol e reidratadas em uma série decrescente de soluções alcoólicas até água corrente. Em seguida, foram coradas com Hematoxilina de Harris por 40 segundos e lavadas em água corrente por 20 minutos. Posteriormente, realizou-se a coloração com Eosina por 1 minuto. Após a coloração, os cortes foram submetidos à desidratação em séries crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem com lamínula e meio de montagem.

Para complementar a análise morfométrica da MEC, outras lâminas foram coradas pelo método Tricrômico de Masson, conforme descrito por Widbiller; Rothmaier; Saliter; Wolflick *et al.*, 2021). Após desparafinação e hidratação, os cortes foram submetidos à Hematoxilina férrica de Weigert por 5 minutos, seguida de lavagem em água corrente. Em seguida, foram corados com Escarlate de Biebrich e fucsina ácida por 5 minutos, diferenciados em ácido fosfotúngstico por 15 minutos e

finalmente corados com azul de anilina por 10 minutos. Após a coloração, procedeu-se à desidratação, diafanização e montagem das lâminas, conforme rotina laboratorial.

4.5 Microscopia de fluorescência / DAPI

As polpas descelularizadas e não descelularizadas foram congeladas em freezer a -20°C e seccionadas a 4µm usando criostato (Lupetec, Brasil), em meio Tissue Tek freezing (Leica). Em seguida, o tecido foi marcado com DAPI (Thermo Fisher Scientific), intercalante de DNA, e visualizado em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51). As imagens foram adquiridas com o programa Olympus CellSens 2011.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

Foram aleatoriamente selecionadas 2 polpas descelularizadas e in natura de cada grupo, totalizando 8 polpas para estudo no MEV. A preparação A aquisição das imagens no exame de microscopia eletrônica de varredura foi feita em parceria com o Professor Dr. Breno Valentim Nogueira, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins - LUCCAR, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Após a coleta, as amostras foram mantidas em água destilada, renovada a cada 24 h. Em seguida, uma sequência ascendente de álcool desidratou as amostras, que foram fixadas em suportes e metalizadas com ouro-paládio. As imagens foram obtidas no microscópio Philips XL 30, operando a 15 kV, com ampliações variando de 30× a 50.000×. Os grupos das polpas in natura, e descelularizadas foram fixados com glutaraldeído (Reagen) 2,5% (v/v) e formaldeído (Reagen) 2% (v/v) em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M (p/v) (pH 7,2 – 7,4) por duas horas à temperatura ambiente e, depois, armazenados a 4°C até o dia seguinte para, então, serem lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M por três vezes, 30 minutos cada vez. Após a fixação, as amostras foram colocadas em tetróxido de ósmio 1% (p/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M adicionado de ferrocianeto de potássio 1,25% (p/v). O recipiente contendo as amostras foi envolto por papel laminado e deixado à temperatura ambiente por uma hora na capela e no escuro. Posteriormente, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M uma vez por 30 minutos e duas vezes, 30 minutos cada, com água miliQ para, então, serem

desidratadas uma sequência ascendente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) à temperatura ambiente e secas pelo ponto crítico (Tousimis Auto Sandri-815, EUA). Em seguida, os fragmentos de polpa foram colados em stubs com fita de carbono (EMS 77816, USA) e, em seguida, foi feita a metalização em atmosfera de argônio com ouro no metalizador (Denton Vacuum Desk V, EUA), utilizando corrente de 30 mA por 60 segundos e espessura aproximada de 200 Å. A visualização do material foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JEM6610 LV, Japão) operado a 20 kV com filamento de tungstênio. Toda a superfície foi examinada a fim de escolher as áreas de amostra mais representativas.

4.7 Tomografia das peças

As peças anatômicas foram obtidas em açougues parceiros, como em todo o trabalho, oriunda de animais abatidos com média de 180 dias de vida. A espécie obtida para a coleta era a uma seleção de cruzamento genético baseado na raça Duroc (informação concedida pelo açougue fornecedor). As hemiarcadas foram posicionadas unidas e congeladas para facilitar o manuseio e a aquisição de imagens. O tomógrafo Carestream 8100 3D foi utilizado com algumas adaptações para que conseguíssemos as imagens.

5 RESULTADOS

Um volume reduzido de polpa foi observado nas posições dentárias de anatomia oral suína P1, P2, P3, P4 que de acordo com o artigo de Sova (2018) eram decíduos. Apenas os últimos molares M1 e M2 (intraósseos) proveram o volume apropriado para a coleta. Isso norteou a escolha desses dentes para a condução do trabalho.

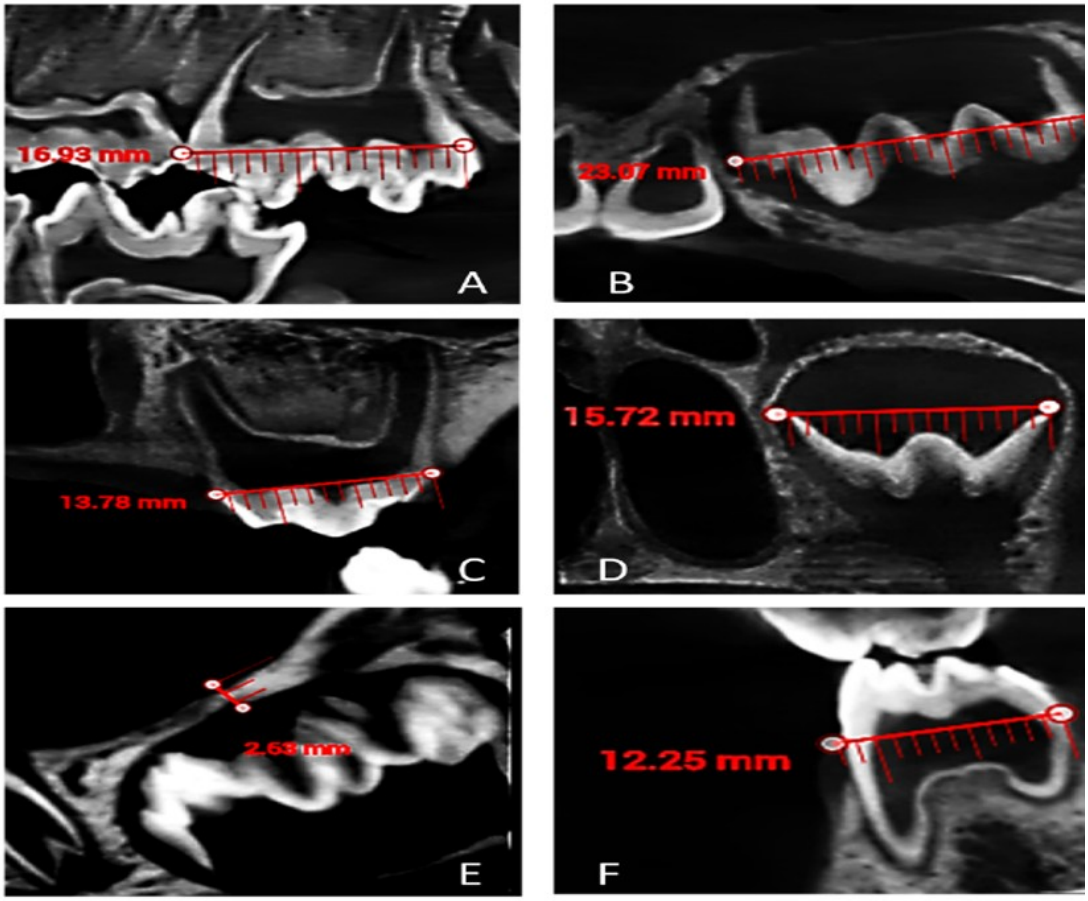
Tabela 2 – Relação de peso in natura por tipo dentário

Tipo dentário	**Relação cabeça/dente coletado**	**Peso total coletado**	**Peso médio por polpa**
***M2**	12,5 cabeças 25 dentes	29,32g	1,168g
M1	12,5 cabeças 50 dentes	18,87g	0,377g

*Coleta feita só em maxila.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Uma vez realizada as coletas, percebemos a necessidade de compreender melhor a anatomia local por meio de exame de imagens tomográficas. Radiografias panorâmicas também foram realizadas, mas por algum motivo, talvez a anatomia alongada da face dos suínos, impediu uma imagem de qualidade ser adquirida. A Figura 4 exibe cortes tomográficos das posições anatômicas M1 e M2, demonstrando a grande diferença de largura e comprimento das dimensões mesio-distal e vestíbulo lateral dos dentes analisados. Mesmo sem plena formação coronária, o dente M2 é bem maior que M1.

Figura 4 – Cortes tomográficos realizados



A: corte tomográfico exibindo a dimensão mésio distal de 16,93mm em um M1 superior.

B: corte tomográfico exibindo a dimensão mésio distal de 23,07 um M2 superior.

C: corte tomográfico exibindo a dimensão vestíbulo palatina de 13,78mm em um M1 superior.

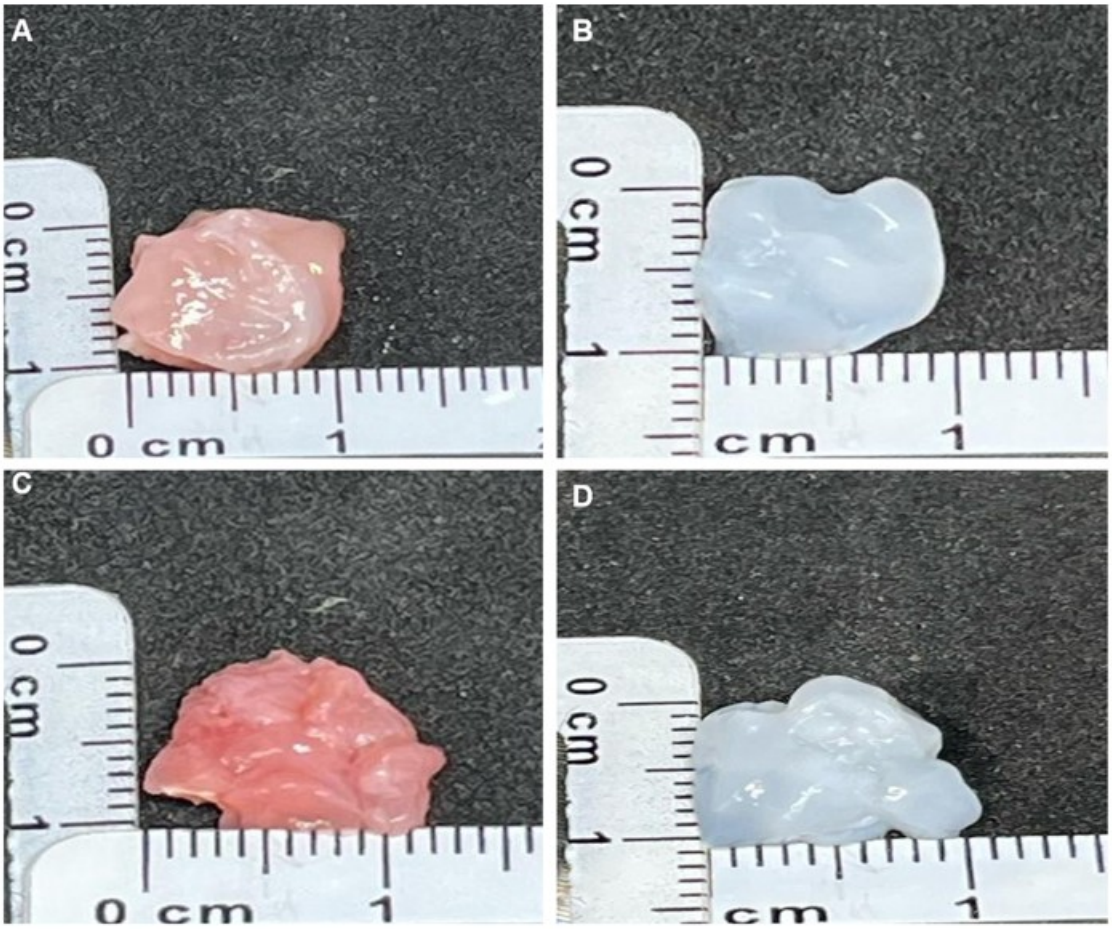
D: corte tomográfico exibindo a dimensão vestíbulo palatina de 15,72mm um M2 superior.

E: corte tomográfico exibindo espessura óssea de 2,63mm acima do germe de um M1 inferior.

F: corte tomográfico exibindo a dimensão vestíbulo lingual de 12,25mm em um M1 inferior.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 5 – Material pronto para ser emblocado e submetido para avaliação histológica



A – Polpa de M2 *in natura*

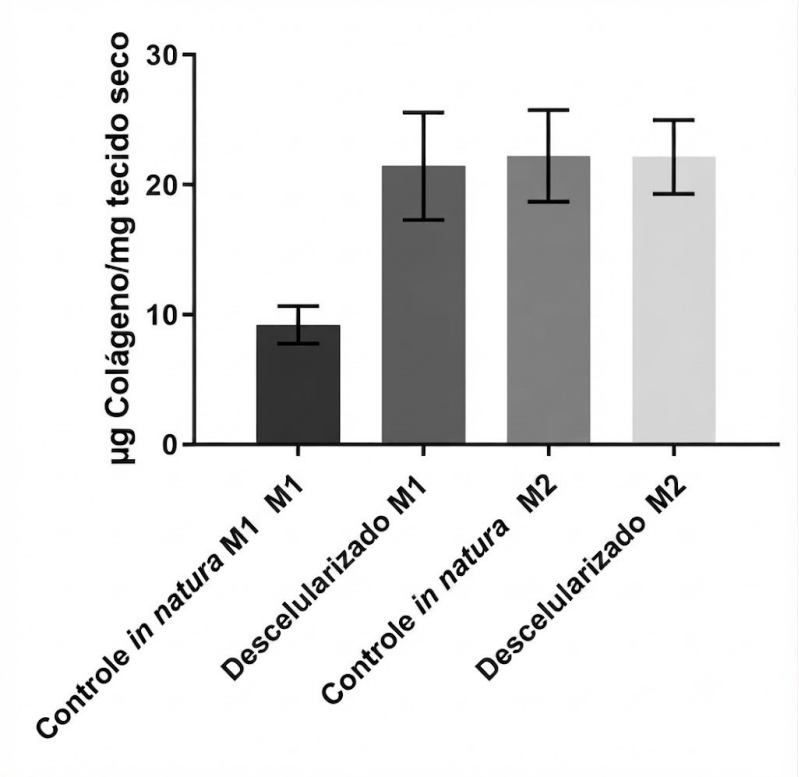
B – Polpa de M2 descelularizada

C – Polpa de M1 *in natura*

D – Polpa de M2 descelularizada

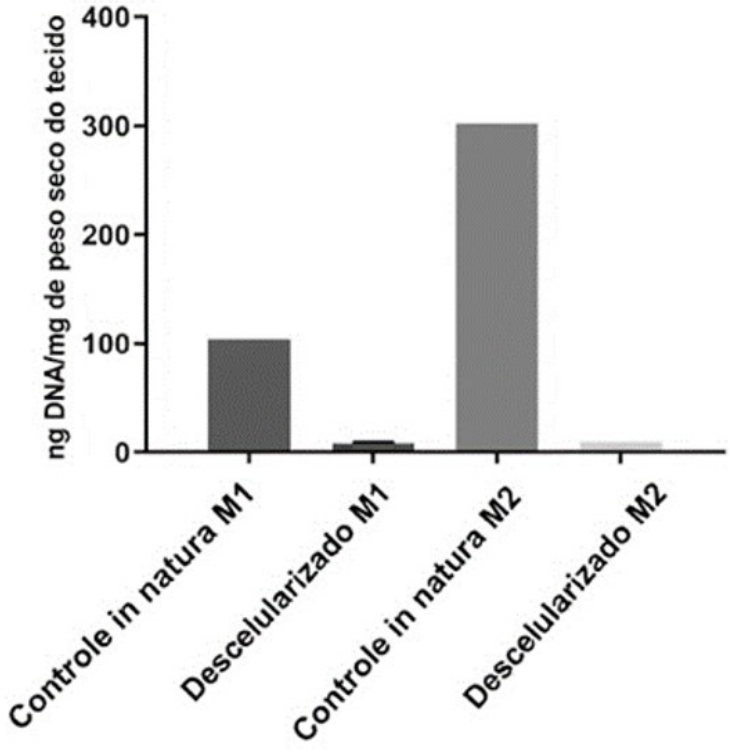
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 6 – Quantificação de colágeno dos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

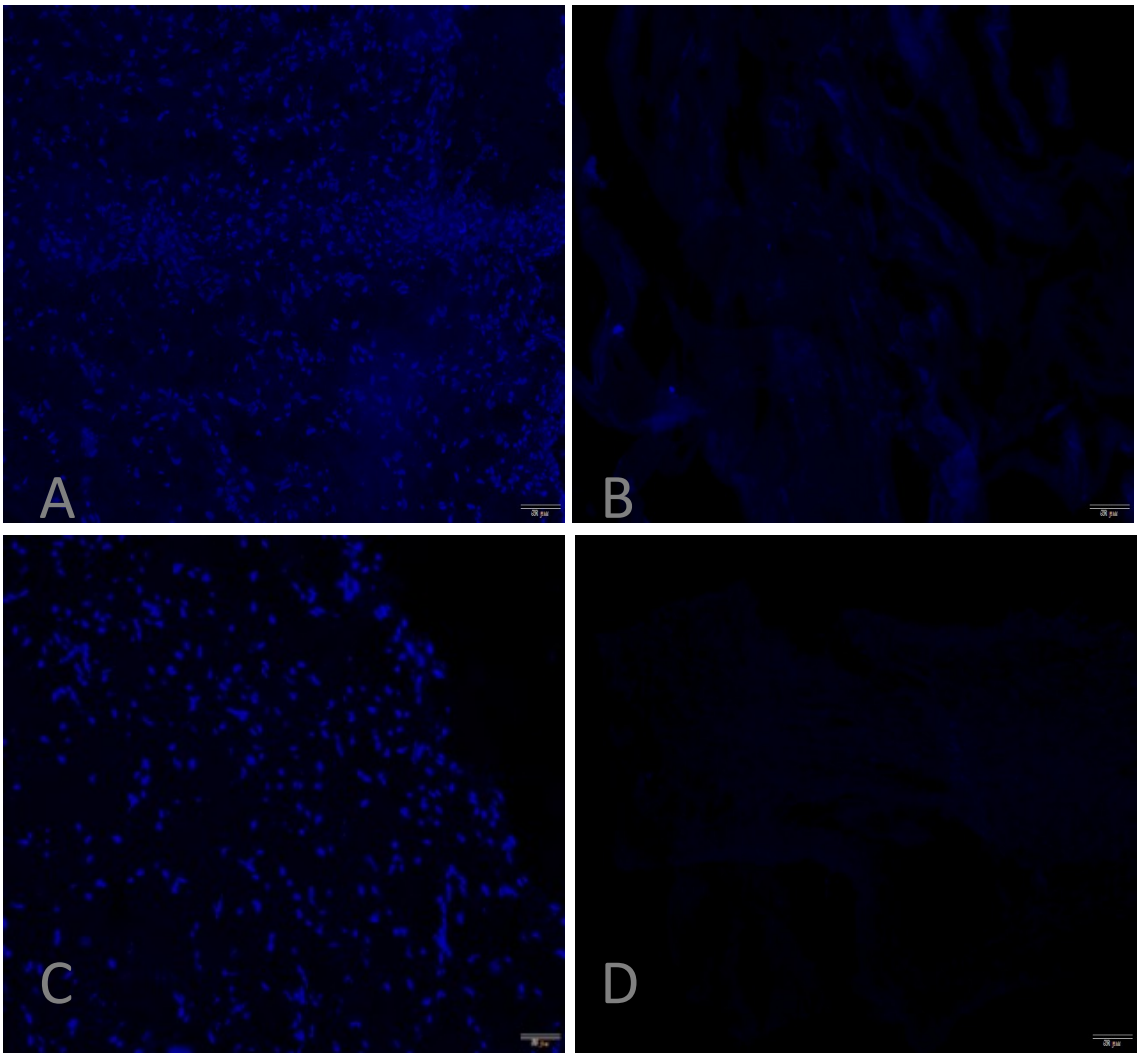
Figura 7 – Quantificação de DNA dos grupos experimentais



Dados expressos como média ± EPM. n=3, **p < 0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 8 – Microscopia de fluorescência dos grupos experimentais - DAPI



A: Grupo in natura M1.

B: Grupo descelularizado M1.

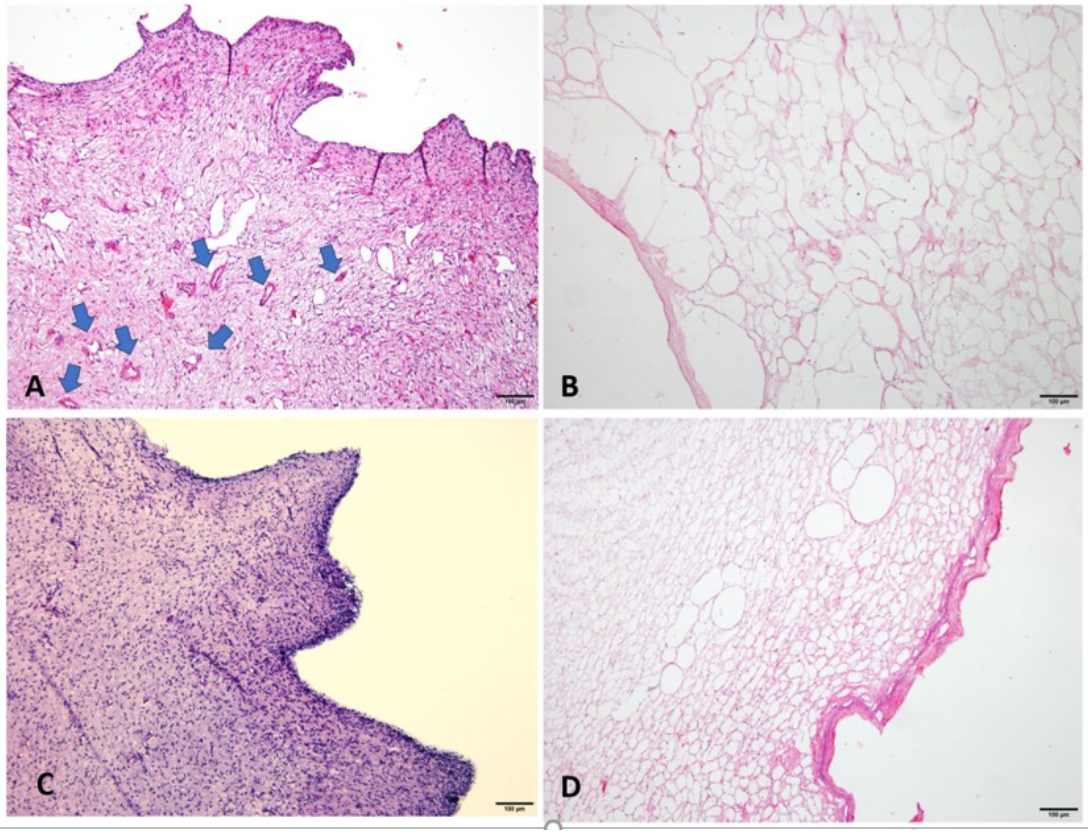
C: Grupo in natura M2.

D: Grupo descelularizado M2.

Barra de escala 50 µm. Lentes 20x.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 9 – Tecidos corados com HE



A: Grupo in natura M1.

B: Grupo descelularizado M1.

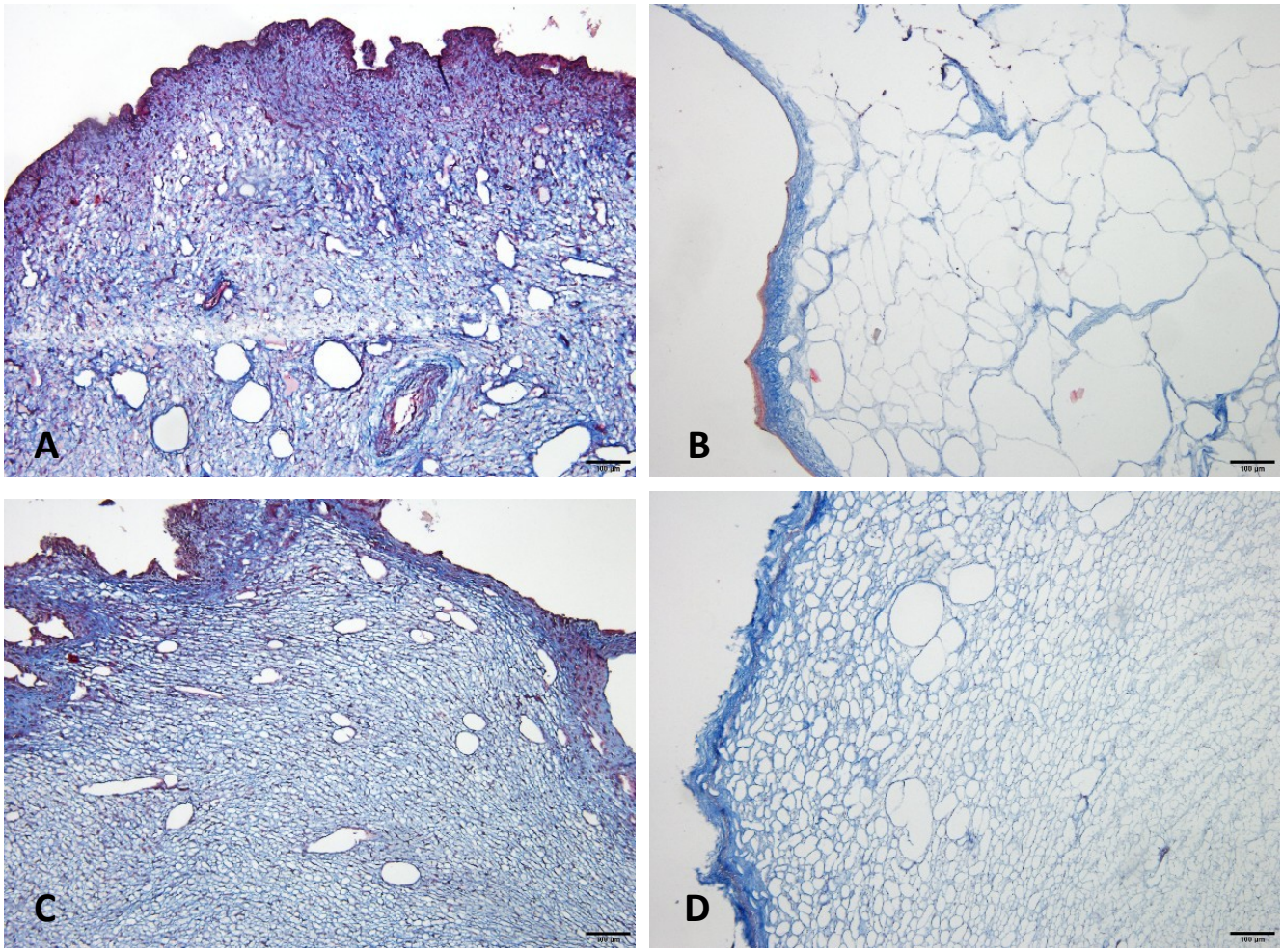
C: Grupo in natura M2.

D: Grupo descelularizado M2.

Barra de escala 100 µm. Lentes 20x

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 10 – Tecidos corados pela técnica de Tricrômico de Masson



A: Grupo in natura M1. Destaque para vasos sanguíneos.

B: Grupo descelularizado M1.

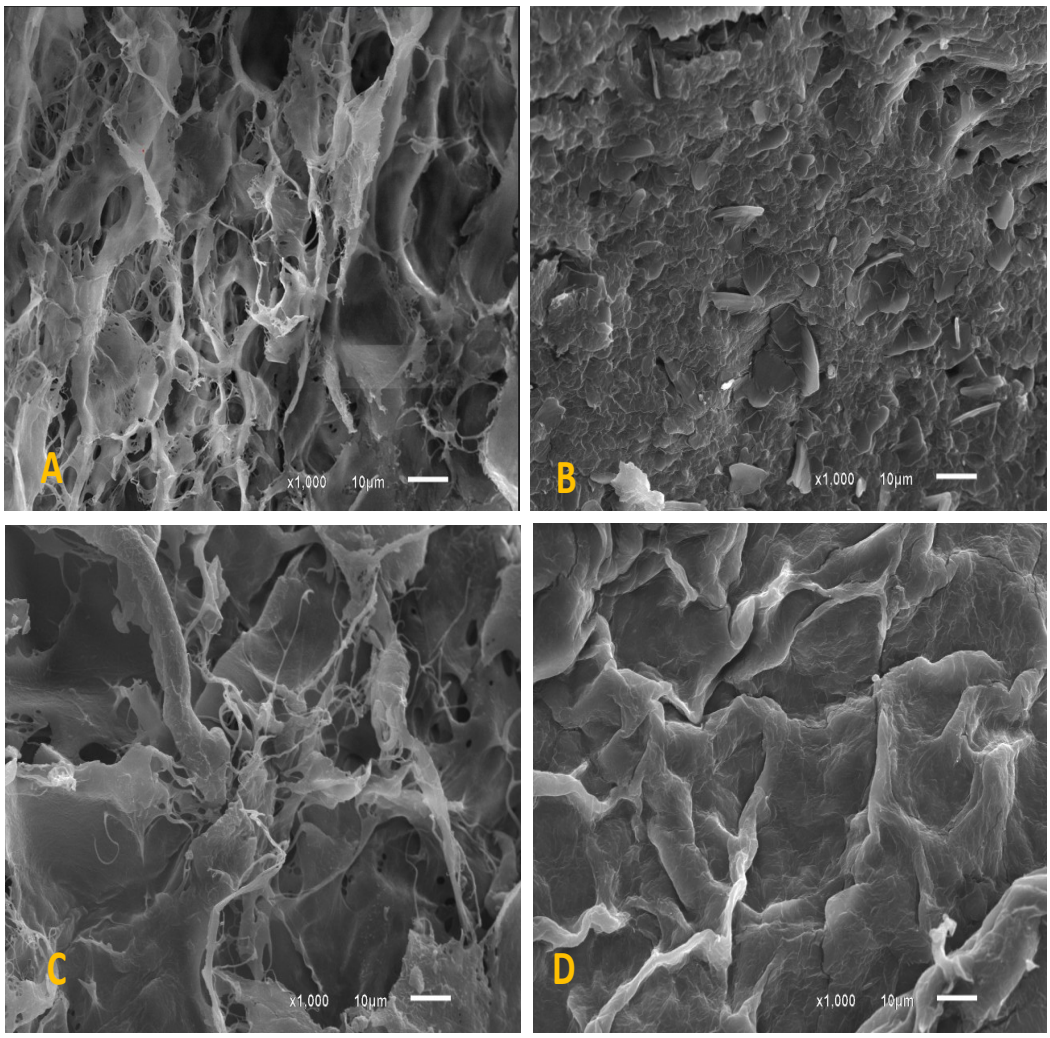
C: Grupo in natura M2.

D: Grupo descelularizado M2.

Barra de escala 100 µm. Lentes 10x.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 11 – Tecidos avaliados em MEV



A: Grupo in natura M2.

B: Grupo descelularizado M2

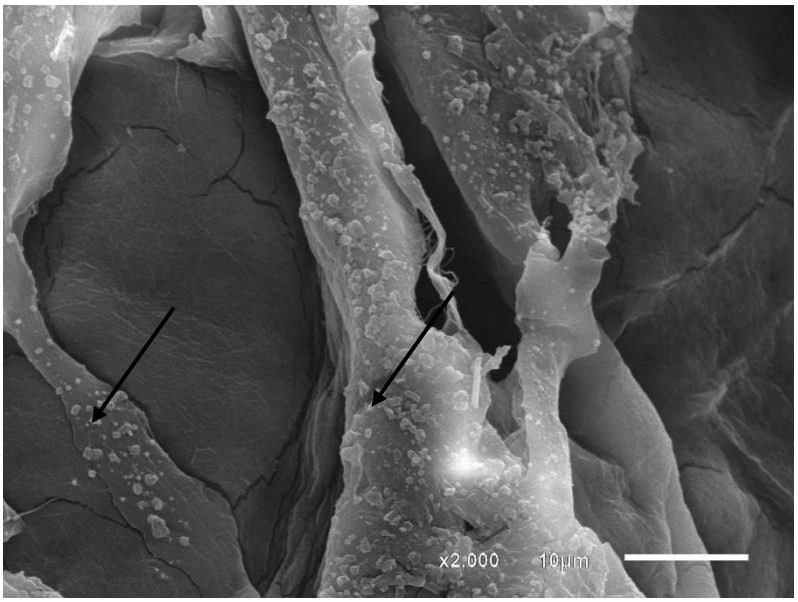
C: Grupo in natura M1

D: Grupo descelularizado M1.

Barra de escala 10 µm. Lentes 1000x

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 12 – Grupo descelularizado M2 com destaques para as incrustações mineralizadas na estrutura de colágeno



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A: Grupo in natura M2 (Tecido de polpa dentária em formação)

Apresenta uma rede porosa tridimensional altamente frouxa, aberta e desorganizada. Observam-se finos feixes de fibras colágenas e elementos celulares preservados que compõem o tecido jovem em desenvolvimento, com espaços interfibrilares amplos e irregulares.

B: Grupo descelularizado M2

Evidencia a remoção bem-sucedida do conteúdo celular, restando uma matriz extracelular mais compactada em comparação ao tecido controle in natura. A superfície da matriz apresenta-se densa, com pequenos fragmentos ou lâminas colapsadas e diminuição aparente dos espaços vazios, indicando o colapso parcial ou reorganização da rede frouxa original após o processo de descelularização.

C: Grupo in natura M1 (Tecido jovem, porém completamente formado)

Organização fibrilar: Mostra uma matriz com fibras colágenas mais espessas, arranjadas de forma tridimensional e com porosidade visível, porém apresentando maior densidade e robustez estrutural do que o tecido em formação (M2). Integridade:

Presença de elementos celulares e uma rede de fibras contínua e entrelaçada característica de um tecido conjuntivo maduro e estabelecido.

D: Grupo descelularizado M1

Aspecto da matriz: Caracteriza-se por uma matriz extracelular densa, com superfícies de aspecto liso, ondulado e compactado ("lamelar" ou em dobras contínuas). Há eliminação total das estruturas celulares, restando um arcabouço fibroso de limites bem definidos, com dobras e ondulações superficiais que refletem a preservação das lâminas de colágeno maduro após a remoção dos componentes celulares.

6 DISCUSSÃO

Uma das razões para consideramos a possibilidade de desenvolver nossa pesquisa a partir de material colhido em dentes de suínos está na disponibilidade de obtenção das carcaças. A indústria de processamento de carnes suínas movimenta toneladas diárias de carne, e esse material é descartado em grande quantidade. 169.700 suínos são abatidos diariamente no brasil por dia. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2026) Uma metodologia de recuperação desse material pode ser implementada na linha de processamento desses suínos elevando exponencialmente a quantidade de material obtido. A compatibilidade genética aumentada entre humanos e suínos (Garcia-Arranz; Villarejo-Campos; Barambio; Garcia Gomez-Herasl, (2022); Yue; Xu; Kan; Zhao et al., (2021) bem como sua comprovada capacidade de fornecer, por exemplo, válvulas cardíacas para xeno transplantes fazem desse espécie animal uma fonte bem amparada para estudar o DNA (Santoro; Consolo; Spiccia; Piola et al., 2016). Bakhtiar, Hengameh; Rajabi, Sarah; Pezeshki-Modaress, Mohammad; Ellini, Mohammad Reza, (2021) trabalharam com polpas dentárias de origem bovina, descelularizando com sucesso e contribuindo para o conhecimento a respeito desse tecido. Contudo, a experiência de trabalho com polpas suínas pode acrescentar uteis conhecimentos para confecção de hidrogéis e arcabouços orgânicos em geral.

A Tabela 2 mostrou que os volumes obtidos in natura de M2 foram de 1,168 g, cerca de 210% maior que 0,377 g. Assim como Ide, Y.; Nakahara, T.; Nasu, M.; Matsunaga, S. et al., (2013), realizamos a obtenção de tomografias dos espécimes utilizados no nosso trabalho. Esse exame foi necessário para uma melhor compreensão das áreas que utilizamos para as coletas. O exame tomográfico mostrou que a coleta de M2 em mandíbula também é possível. Contudo, nas peças suínas adquiridas, sempre estavam em posição intraóssea, dada a cronologia de erupção desses animais e a data em que sempre ocorre o abate, que é em torno de 180 dias. O osso mandibular que é bastante mais duro naturalmente que o osso maxilar. A Figura 4E ilustra a distância de 2.6mm de osso mandibular recobrindo o elemento M2 em formação. Apesar de não ser um volume muito grande de osso, para a obtenção dessas polpas seria necessário uso de discos de corte ou que as mandíbulas fossem quebradas para expor esse local de coleta. Considerando a facilidade de coleta e o

grande volume disponível nas posições anatômicas M2 superiores, optamos por não coletar M2 em mandíbulas. Apesar de ser claramente possível. Uma metodologia para coletar essa polpa pode ser desenvolvida e duplicar a quantidade de polpa de germes dentários M2 colhidos em uma cabeça suína. Na posição dos dentes M2, bastava com uso de uma alavanca, fraturar a tabua óssea sem dificuldades na região do túber. Com esse acesso, encontrávamos facilmente o germe dentário a ser coletado (M2 ainda em formação). A anatomia dentária suína é um fator de relevância para a obtenção das polpas. Durante a coleta, pudemos observar que apenas os últimos molares tanto superiores quanto inferiores demonstravam um bom volume pulpar. Os demais dentes apresentam muito baixo volume pulpar, à exceção das presas suínas (caninos). As porções radiculares dos molares são de pouca relevância para obtenção de material. Apresenta uma polpa dentária de pouco volume e difícil acesso. Extrações radiculares previamente a remoção tecidual também são pouco úteis, já que, como descrito por Sasaki; Matsumine; Watanabe; Yamato et al. (2015), as raízes tendem a fraturar no procedimento. O volume obtido não foi descrito, porém tanto em observações de nosso trabalho como nas descrições do trabalho dele, os volumes pulpares dos incisivos são sempre baixo. Em nosso trabalho, conforme demonstrado na Tabela 2, o peso médio de uma polpa in natura de M2 foi de 1,168 g. Isso é aproximadamente 210% maior que as 0,377 de peso médio de uma polpa de M1.

A reduzida literatura descrevendo aspectos da anatomia em suínos de criação e abate, nos leva a avaliar a cronologia de erupção dentária em artigos realizados em diferentes linhagens, o que pode induzir a erros. Há uma grande ausência de bons atlas modernos que reúnam a cronologia e também um catálogo visual para identificação dentaria. Uma variação cronológica em animais geneticamente uniformes, mesma dieta, mesmo ambiente foi observada por Anezaki, (2009). Ele atribui essa variação, entre outros fatores, à hierarquia de amamentação. Ou seja: nem controle genético e nutricional elimina completamente a possibilidade de alguma variabilidade cronológica.

Dai et al., (2020) realizou comparativo formação dentária considerando os estágios de Nolla em M2 e M3 suínos. O objetivo era ver se o software e avaliadores teriam acertado corretamente os estágios, baseado em tomografias. O estudo chinês teve amostras entre 5 e 9 meses no momento do abate. No artigo de Sova, (2018), mais precisamente naseção de materiais e métodos, o autor teve a cautela de

descrever a linhagem trabalhada como sendo desconhecida. Nesse trabalho, os molares permanentes foram extraídos de hemimandíbulas de suínos de produção saudáveis com aproximadamente 6 meses de idade (raça desconhecida). Os primeiros molares (M1) estavam em oclusão, enquanto os segundos e terceiros molares (M2 e M3) não haviam irrompido. As coroas dos M2 estavam completamente formadas, mas a formação da raiz ainda não havia começado. Os terceiros molares (M3) ainda eram muito pequenos em relação ao seu tamanho final. Isso foi compatível com nossas tomografias. Outro trabalho considerado foi o de Ide, Yoshiaki; Nakahara, Taka; Nasu, Masanori; Matsunaga, Satoru et al., que em 2013 realizou avaliação tomográfica na mandíbula de mini porcos, aos 7 meses e aos 29 meses de idade (adulto). A nossa própria tomografia e avaliação direta das peças suínas, nos permitiu considerar que as polpas que coletamos foram de M1 erupcionado e M2 em formação. A avaliação das imagens desses estudos, estava em com a tabela de cronologia de erupção dentaria descrita por GETTY (1986) e Magnell (2007). Não encontramos dados específicos de cronologia de erupção em Durocs. s

Elnawam; Abdallah; Nouh; Khalil et al. (2024), em recente trabalho de revisão sistemática que adotou as diretrizes PRISMA para seleção dos artigos, encontrou 387 estudos. Desses, somente 17 estudos foram incluídos para análise. Na maioria dos estudos, quando usado como arcabouços com ou sem células exógenas, a matriz pulpar descelularizada mostrou o potencial de aumentar a angiogênese, a dentinogênese e regenerar tecidos semelhantes a polpa e dentina. No entanto, os estudos incluídos mostraram heterogeneidade de métodos de descelularização, modelos animais, fonte, forma e entrega do arcabouço enxertado, bem como alto risco de viés e qualidade média das evidências. Fica evidente que ainda não há um protocolo padrão ouro para descelularização de polpas. Isso nos levou adotar um protocolo próprio do laboratório, desenvolvido, testado e aprovado para tecido de pele de tilápia. A escolha permitiu poupar recursos já que boa parte dos insumos necessários já estava disponível. E ainda serviu para demonstrar que esse protocolo, patenteado pelo grupo de estudos Genetec, é versátil e pode ser utilizado em outros estudos.

A utilização do triton foi evitada em nosso planejamento apesar de ele ser uma solução detergente à base de éter de polietileno (geralmente Triton X-100) amplamente utilizada como agente descelularizante em engenharia de tecidos. No

entanto, seu uso apresenta Citotoxicidade residual, Danos à matriz extracelular (MEC). O Triton pode degradar componentes importantes da MEC, como colágeno e glicosaminoglicanos, comprometendo a integridade estrutural e funcional do tecido. Potencial inflamatório, e incompatibilidade com alguns tipos celulares: certos tipos de células podem ser mais sensíveis aos resíduos do Triton, prejudicando a recelularização (Gilpin; Yang, 2017). Essas limitações fazem com que o Triton seja frequentemente combinado com outros agentes ou submetido a protocolos rigorosos de lavagem para minimizar seus efeitos adversos (Sullivan; Mirmalek-Sani; Deegan; Baptista et al., 2012).

Traphagen; Fourligas; Xylas; Sengupta et al. (2012) fizeram um dos poucos trabalhos encontrados nesta pesquisa que avaliou o potencial do tecido pulpar obtido de germes dentários. Apesar de também ter colhido germes dentários de M1 e M2, o trabalho não focou nas diferenças entre M1 e M2, tendo observado as diferenças obtidas entre tecido descelularizado e tecido recelularizado. Contudo, não comparou seus resultados com a descelularização de dentes já totalmente formados, uma vez que trabalhou com germes dentários, algumas vezes definidos como brotos dentários, o que na prática se referem a dentes em formação. A não definição sobre o tecido especifico trabalhado (M1 ou M2), além de um protocolo de desmineralização aplicado, pode ter feito se perder dados de mineralização das polpas, como aquelas que pudemos verificar em nosso trabalho (Figura 13). Traphagen; Fourligas; Xylas; Sengupta et al., (2012) usaram polpas M1 para observar a morfologia e a integridade estrutural da polpa, enquanto M2 foi usado para medir quantitativamente a remoção celular (DNA) e caracterizar histologicamente os tecidos após descelularização. O autor não considerou as diferenças existentes. Com um proposito diferente no seu trabalho, um protocolo de descelularização foi considerado superior aos demais testados por ele. De maneira resumida, o protocolo consistia em: 48h em Tampão Hipotônico seguido de 5 ciclos alternados de SDS 1% (24h) e Triton X-100 1% (24h). Tratamento com Nucleases (DNase/RNase) para degradar material genético restante. Nosso protocolo é mais conservador com a matriz extracelular (menos SDS, sem Triton, sem tampão hipotônico prolongado), o que pode ser bom para preservar colágeno e laminina. A não utilização de nucleases não foi problema, já que houve significativa redução de DNA nas polpas tratadas. Alguns estudos foram desenvolvidos utilizando germes dentários de suínos em uma estratégia integrada e

progressiva voltada à regeneração dentária completa, visando superar as falhas e complicações a longo prazo associadas aos implantes sintéticos tradicionais de titânio (Zhang; Vazquez; Oreadi; Yelick, 2017; Zhang; Yelick, 2025). Nesses trabalhos, foram desenvolvidas técnicas bem-sucedidas para isolar e caracterizar células-tronco e tipos celulares específicos a partir de brotos dentários suínos em estágio embrionário, incluindo células epiteliais com fenótipo de ameloblastos e células endoteliais vasculares capazes de formar estruturas tubulares (Nasu; Nakahara; Tominaga; Tamaki et al., 2013; Zhang; Vazquez; Oreadi; Yelick, 2017; Zhang; Yelick, 2025). Paralelamente, foram aprimorados protocolos para descelularizar e desmineralizar brotos dentários suínos preservando os gradientes naturais de proteínas da matriz extracelular (MEC) (Traphagen; Fourligas; Xylas; Sengupta, 2012). A viabilidade desses arcabouços estruturais (dTBs) foi confirmada ao demonstrarem capacidade de orientar a recelularização e a diferenciação de tecidos quando povoados por células dentárias humanas e suínas (Nakahara; Tominaga; Toyomura; Tachibana, 2016). A implantação in vivo desses arcabouços biológicos em miniporcos comprovou com sucesso a formação de dentes em bioengenharia funcional, com produção organizada de dentina, esmalte e ligamentos periodontais.(Zhang; Yelick, 2025). Contudo, nenhum desses de dedicou a avaliar de maneira aprofundada as características das polpas desses germes dentários descelularizados conforme fizemos em nosso trabalho.

O protocolo descrito por Bakhtiar, H.; Rajabi, S.; Pezeshki-Modaress, M.; Ellini, M. R. , (2021) para descelularização de polpas dentárias bovinas não descreve as concentrações de Triton utilizadas. Após testar diferentes formulações para descelularizar, o protocolo de tratamento com EDTA/Tripsina por 12 horas e Triton X-100 por 1 hora, sem tratamento com SDS foi escolhido pelo autor como superior aos demais testados. Em nosso trabalho, opção por uma concentração reduzida de SDS visou minimizar possíveis danos à matriz extracelular, preservando sua arquitetura e composição bioquímica. Além disso, o pré-tratamento com EDTA favorece a dissociação celular por meio da quelação de íons divalentes, potencializando a ação subsequente do detergente. Dessa forma, buscou-se estabelecer um equilíbrio entre a eficiência da remoção celular e a manutenção das propriedades estruturais da matriz extracelular. O fato de os autores desse estudo terem utilizado polpas de bovinos pode ser eventualmente justificado pelo maior volume dentário do animal. Contudo,

suínos são mais amplamente reconhecidos por similaridade de estrutura anatômica geral com os humanos. (Fagundes; Taha, 2004) mostrou que os suínos, são muito citados em trabalhos latino-americanos em cirurgia (46%), devido à sua correspondência anatômica onde é tido como animal ideal para treinamento e pesquisa em cirurgia por mini acesso. Isso reforça a importância de trabalhar com suínos, diferentemente do que Bakhtiar, Hengameh; Rajabi, Sarah; Pezeshki-Modaress, Mohammad; Ellini, Mohammad Reza, (2021) realizaram com a polpa dentária bovina. Comparativos futuros podem ser relevantes para elucidar possíveis diferenças entre essas polpas, quando submetidas aos mesmos ensaios laboratoriais. Os diferentes modos de descelurarização presentes nos artigos dificultam comparativos.

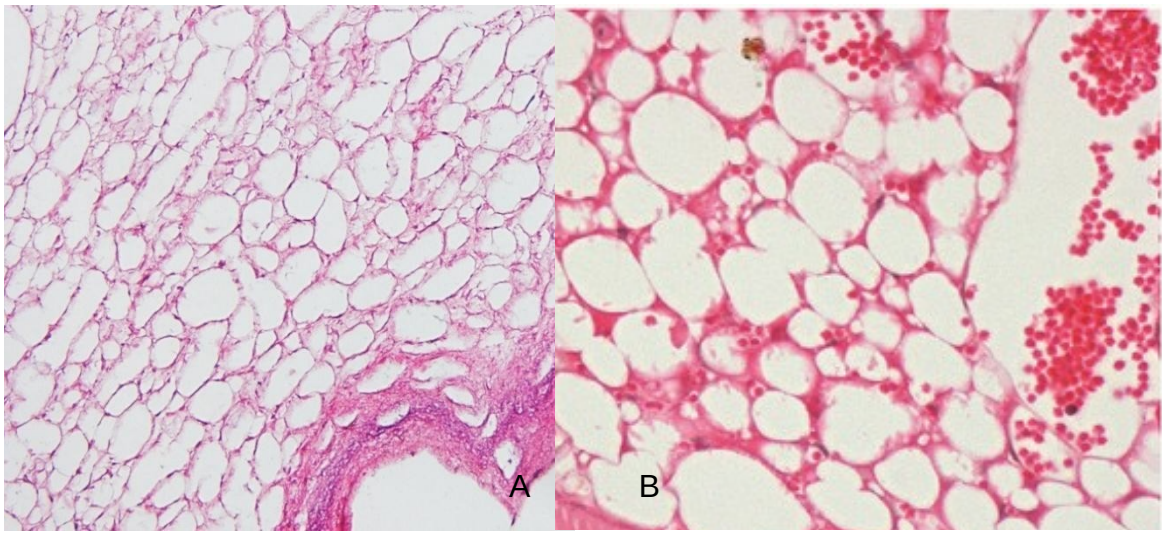
Nosso trabalho não objetivou a comparação de nosso protocolo com os demais protocolos, o que exigiria reproduzir os complexos e muito diversos esquemas de descelularização já descritos na bibliografia consultada. Contudo, foi possível observar que além de ter sido eficiente em descelularizar, nosso procedimento não fez uso de enzimas. (Yuan et al., 2023) utilizaram um método essencialmente enzimático em seus estudos. Apesar de muitas metodologias fazerem uso desses agentes enzimáticos, a ausência de agentes enzimáticos foi proposital em nosso trabalho. Objetivamos a preservação da integridade da matriz extracelular e redução de custos, mas ainda assim estando conforme diretrizes de protocolos alternativos descritos na literatura (Crapo; Gilbert; Badylak, 2011).

A coloração de tricrômico de Masson foi utilizada por corar bem as fibras de colágeno. Embora o tricrômico de Masson core o colágeno predominantemente em azul/verde, fibras de colágeno altamente densas, compactadas ou parcialmente desnaturadas (pelo uso de detergentes agressivos como o SDS ou NaOH) podem apresentar afinidade alterada para corantes aniônicos pequenos, como a fucsina ácida e a xilidina ponceau (corantes vermelhos da técnica) (Widbiller et al., 2021; Yu; Chapman, 2003). Visualmente os testes demonstraram diferenças perceptíveis em coloração. Na Figura 10B: Grupo descelularizado M1, uma borda avermelhada pode ser observada, e se apresentou ausente na Figura 10D: Grupo descelularizado M2. Essa margem avermelhada no grupo M1 descelularizado, observou-se uma faixa periférica com coloração predominantemente avermelhada na técnica de Tricrômico de Masson. A análise por H&E revelou que essa mesma região apresenta maior

densidade fibrilar e total ausência de núcleos celulares ou detritos basofílicos. Portanto, sugere-se que essa marcação periférica não representa falha na descelularização por resíduos celulares, mas sim um artefato técnico decorrente da compactação e desnaturação parcial das fibras de colágeno na borda do fragmento, gerada pelo estresse mecânico/químico do protocolo e posterior retração tecidual durante o processamento histológico. Isso corrobora que o protocolo testado foi eficaz, mas que os tecidos pulpares em diferentes estágios de formação se comportam de maneira diferente frente às técnicas de descelularização, impactando também nas colorações empregadas para estudo. Tanto na coloração de HE quanto Masson, a trama tecidual se apresentou mais bem preservada em M2 descelularizado.

Após os procedimentos de descelularização, observamos que os dois tecidos se comportaram de maneira diferente aos processos. A MEC obtida nas polpas de dentes M1, apresentou em todas as lâminas e colorações realizadas, uma estrutura de trama mais aberta, com grandes áreas vazias. No aspecto da descelularização, a redução de núcleos foi obtida com sucesso nos dois tipos de polpa, conforme imagens das pranchas da Figura 9. Além das diferenças em quantidades de colágeno, a estruturação vascular pode ser relevante para explicar o comportamento frente aos agentes de descelularização. Essa rede vascular, corresponde a até quatorze por cento do volume tecidual em polpas de dentes formados (Lopes; Siqueira, 2015). Isso pode talvez ter afetado a descelularização pela facilidade de acesso às partes profundas para as substâncias descelularizantes. Nas figuras 09 e 10, seja por coloração H&E ou Masson, foi possível observar que os tecidos maduros, das polpas de M1 tinham um competente vascular muito mais bem definido. A presença de células endoteliais coradas mais densamente em vermelho em H&E e em roxo escuro no Massom, não foi notada dos tecidos imaturos de M2. Componentes importantes de neoformação endotelial podem ser mantidos em matrizes descelularizadas (Ostadi, 2024; Cortiella, 2010). Considerando os diferentes estágios de maturação das polpas, gradientes modificados de fatores de proliferação endotelial podem estar presentes. Futuras análises especificas dos componentes vasculares podem ser importantes para melhor elucidar os diferentes resultados observados.

Figura 13 – Comparativo de tecidos corados pela técnica de HE



A: lâmina de polpa do Grupo M2 descelularizada.

B: Figura extraída de trabalho de Hu; Gao; Xu; Zhu *et al.*, (2017)

Barra de escala 50 µm. Lentes 20x.

Fonte: A – Elaborado pelo autor (2025); B – Hu et al. (2017).

Observando a literatura em busca de trabalhos similares, foi possível observar que o aspecto geral das polpas descelularizadas seguem um padrão de MEC, mesmo considerando outras técnicas aplicadas. A observação morfológica da polpa dentária descelularizada em nosso trabalho evidenciou que ocorreu mudança de sua cor original de vermelho claro para um branco leitoso translúcido após a descelularização (Figuras 2D e 5), compatível com o trabalho de (Tan et al., 2021). A porosidade dos arcabouços obtidos por descelularização influencia de maneira significativa a capacidade de adesão celular quando a recelularização é almejada. Em 2005, O'Brien; Harley; Yannas; Gibson, (2005) e colaboradores mostraram que cada tipo celular apresenta uma faixa ideal de tamanho de poros, dentro do qual a adesão ocorre de forma eficiente. Esse achado evidencia a relevância de manter os arcabouços descelularizados o mais próximo possível da estrutura natural, evitando a degradação da matriz extracelular e o aumento excessivo da porosidade, que poderia comprometer a adesão celula (O'Brien; Harley; Yannas; Gibson, 2005). Contudo, nosso trabalho demonstra que usando a mesma técnica em tecidos obtidos nos mesmos exemplares, mas de dentes em diferentes estágios de formação e diferente anatomia (M1 e M2 por exemplo), foi possível observar diferenças na quantidade de áreas vazias, bem como diferentes tamanhos dessas áreas. Figuras 10 e 11. No

trabalho de Hu et al., (2017), a polpa utilizada foi a de uma presa (canino) do suíno. A Figura 13 mostra a semelhança estrutural típica dos tecidos pulpares. Apesar de ambas as amostras terem sido coradas por HE, variações de técnica, marca comercial, e temperatura ambiente podem fazer ocorrer diferenças colorimétricas. A quantificação de DNA, ilustrada na Figura 7, demonstrou que ambos tecidos foram descelularizados com sucesso, obtendo quantidades inferiores a 50ng por mg de peso seco. O fato da quantidade de DNA por mg de tecido ter ficado em média abaixo de 0,005 ng/mg representa outro indicio que corrobora a descelularização do material. Esse valor representa uma diminuição de em média 99,0% da quantidade de DNA presente no tecido após o processo de descelularização. Essa diminuição do conteúdo de DNA encontra-se dentro da faixa obtida em trabalhos como o de wolf; Daly; Brennan-Pierce; Johnson et al., (2012) que obtiveram uma redução de 99,5% (7,42±1,67 ng/mg de DNA na matriz para 1549 ±489 ng/mg de DNA no controle), porém era baseado em um protocolo bem mais complexo e agressivo que o utilizado nesse trabalho. Contudo, chamou a atenção a grande diferença observada nos tecidos in natura analisados. O dente M2, cuja polpa apresenta um tecido imaturo e em formação, apresentou 3x mais DNA em comparação ao in natura dente M1. Do mesmo modo, acreditamos que as diferenças observadas na quantificação de colágeno, ilustrada na Figura 6, também estejam relacionadas a essa grande diferença de presença de DNA dos tecidos.

As análises de quantificação de colágeno demonstraram que no grupo das polpas dentárias de M2, os níveis de colágeno foram mantidos, sem perdas no processo de descelularização. No grupo das polpas de M1, houve um notável aumento de colágeno detectado. Acreditamos que ao descelularizar as polpas dos dentes M1, fomos capazes de deixar mais fibras colágenas expostas, ao promover uma grande redução de núcleos celulares. Os níveis de colágeno mais baixos observados em M1 in natura comparado a M2 in natura, deixa claro que essas fibras colágenas estiveram de alguma forma menos acessíveis no momento da quantificação. O aumento da concentração de colágeno observado após a descelularização não necessariamente indica síntese ou ganho absoluto de colágeno. Esse resultado pode ser atribuído à remoção eficiente de componentes celulares e proteínas não colagênicas da matriz extracelular, levando ao enriquecimento relativo da fração colagênica quando os dados são normalizados pela massa seca do tecido

seguindo a equação: Concentração =Massa da proteína (Colágeno)/Peso total do tecido seco. A preservação do colágeno após a descelularização sugere que o protocolo empregado foi capaz de remover material celular mantendo a integridade da matriz extracelular fibrilar. O trabalho de Yuan; Yang; Wang; Chen et al., (2023) apresentou o mesmo aumento nos índices de colágeno, ao comparar o tecido in natura e o descelularizado. A distribuição desigual das células ao longo da polpa pode também influenciar as avaliações. Os fibroblastos são células responsáveis pela produção da matriz extracelular da polpa dentária. (Junqueira; Carneiro; Contopoulos). Eles são encontrados em toda a polpa dentária, incluindo a periferia e o centro. As células imunes são responsáveis pela defesa da polpa dentária contra infecções. Elas são encontradas em toda a polpa dentária, mas são mais abundantes na periferia. Já as células epiteliais são encontradas na superfície externa da polpa dentária. (Nanci, 2013). Os resultados obtidos para o grupo in natura M2 demonstraram níveis elevados de colágeno, que se mantiveram altos mesmo após a descelularização. Esse achado foi sustentado pelos valores de absorbância obtidos na quantificação de hidroxiprolina, onde as leituras de Abs1, Abs2 e Abs3 apresentaram médias superiores em relação às demais condições experimentais. A aplicação da curva padrão confirmou que a concentração de colágeno por massa de tecido seco no M2 in natura era significativamente elevada, evidenciando que esse tecido possui naturalmente uma maior densidade de matriz extracelular rica em colágeno. Esses dados reforçam a robustez do tecido dentário do M2 como fonte de matriz colagênica, mantendo sua integridade estrutural mesmo após os processos de análise.

Para melhorar nossa compreensão sobre a estrutura desses tecidos, realizamos a microscopia eletrônica de varredura. A porosidade dos arcabouços obtidos após a descelularização demonstrou eficiente remoção dos núcleos celulares em ambas as amostras. Nos tecidos obtidos de polpas M2 in natura, foi possível observar a presença de estruturas cristalinas, decorrentes do processo natural de mineralização para a formação dentária. Essas mineralizações foram observadas apenas nos cortes avaliados de polpas M2 descelularizadas, e ausentemos demais grupos (Vide Figura 12). A presença das incrustações mineralizadas em M2 descelularizado merece melhor avaliação quanto a possíveis influencias no resultado do arcabouço obtido. A matriz extracelular (MEC) normal da polpa dentária formada, é um tecido não mineralizado; no entanto, as células da polpa expressam um conjunto

de fatores de crescimento e citocinas em proporções específicas que podem regular a mineralização em resposta a estímulos externos (Cooper; Holder; Smith, 2014). Balic et al., (2023) demonstraram que em polpas submetidas aos processos cariosos com resposta inflamatória, as fibras de fibronectina apresentaram menor tensão, indicando remodelação patológica da ECM. Isso comprova que mesmo após a formação pulpar, situações locais podem alterar a composição e aspecto geral da polpa. Rathinam et al., (2021) demonstraram ao trabalhar com diferentes materiais capeadores de polpa, observaram que as diferentes disponibilidades de cálcio para as células tronco pulpares, são fator chave da diferenciação celular. Uma vez que o cálcio é um elemento constucional básico dos dentes, (Linde, 1995) diferenças podem ser eventualmente observadas na diferenciação celular. Os níveis de cálcio vão aumentando gradualmente conforme ocorre a maturação tecidual. O mineral principal é hidroxiapatita, associado às fibras de colágeno tipo 1 (Linde, 1995). Com isso, é esperado que quanto mais próximo a coroa em formação, mais estruturas calcificadas possam ser visualizadas. Linde, (1995), Balic, (2023), Lee, (2020) observaram em seus trabalhos que polpas dentárias descelularizadas guardam elevado potencial de proliferação celular e calcificação dessa matriz, assim como elas são capazes de se calcificar distroficamente nos dentes in vivo. Há falta de trabalhos que descrevem MEVs de polpas dentárias em geral, deixando a intepretação de nossas imagens dificultada. He, Chou, Chen, Stoller et al., (2022) avaliaram a mineralização da polpa dentária por microscopia eletrônica. Biomoléculas relacionadas à mineralização foram identificadas próximas a feixes neurovasculares, e SEM/STEM revelaram partículas nano/micrométricas nos túbulos dentinários e agregados esferulíticos de minerais na matriz colágena. Essas mineralizações foram correspondentes às que encontramos em nosso estudo, ao avaliar as polpas de M2 em formação.

7 CONCLUSÕES

As matrizes descelularizadas podem oferecer uma alternativa biomimética promissora aos procedimentos endodônticos regenerativos. Essas estruturas sem células podem fornecer um potencial arcabouço pronto para uso para regeneração de polpa. No entanto, devido à heterogeneidade dos métodos de descelularização, novos estudos precisam ser realizados para elucidar o diferente comportamento dessas MEC, em aplicações clinico-laboratoriais. Nosso trabalho foi capaz de descelularizar com sucesso dois tipos diferentes de polpa dentária suína. Após isso, foi possível estabelecer que tecidos de grupos dentários diferentes e em diferentes graus de maturação tecidual, apresentam características distintas frente aos agentes descelularizantes. Considerando os volumes obtidos nos diferentes grupos dentários analisados, a polpa do M2, foi obtida em maior quantidade por dente. A histologia, sugere uma maior preservação estrutural da polpa M2. após a descelularização, bem como uma maior quantidade de colágeno em comparação com a polpa do dente M1. A presença bem nítida de vasos sanguíneos em M1 in natura, e ausentes ou em formação em M2 também foi uma diferença. A MEV forneceu evidências para a preservação de componentes cruciais dentro das duas matrizes descelularizadas. As imagens mostraram que, em comparação com o tecido nativo, embora a estrutura da rede fibrosa da MEC estivesse exposta, uma parte significativa dos componentes da matriz extracelular ainda estavam mantidos. A remoção celular deixou o tecido poroso e apto para uma recelularização tridimensional do arcabouço. Mineralizações foram observáveis nos tecidos descelularizados de M2. Mais testes devem ser realizados com a polpa dos dentes M2 e M1, para que sejam avaliados os diferentes estágios de formação radicular nos mesmos grupos dentais. Conhecendo como obter, descelularizar e sabendo que a quantidade coletada é previsível, demais trabalhos podem se valer desse tecido pulpar para testar técnicas de recelularização, reimplantes, e testes subcutâneos em cobaias.

REFERÊNCIAS

ADANIR, N.; KHURSHID, Z.; RATNAYAKE, J. The Regenerative Potential of Decellularized Dental Pulp Extracellular Matrix: A Systematic Review. **Materials (Basel)**, 15, n. 18, Sep 14 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019.

AGMON, G.; CHRISTMAN, K. L. Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. **Curr Opin Solid State Mater Sci**, 20, n. 4, p. 193-201, Aug 2016.

ALKSNE, M.; KALVAITYTE, M.; SIMOLIUNAS, E.; GENDVILIENE, I. *et al.* Dental pulp stem cell-derived extracellular matrix: autologous tool boosting bone regeneration. **Cytotherapy**, 24, n. 6, p. 597-607, Jun 2022.

ALLEN, R. A.; SELTZ, L. M.; JIANG, H.; KASICK, R. T. *et al.* Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. **Tissue Eng Part A**, 16, n. 11, p. 3363-3374, Nov 2010.

ALTAII, M.; KAIDONIS, X.; KOBLAR, S.; CATHRO, P. *et al.* Platelet rich plasma and dentine effect on sheep dental pulp cells regeneration/revitalization ability (in vitro). **Aust Dent J**, 62, n. 1, p. 39-46, Mar 2017.

BAKHTIAR, H.; RAJABI, S.; PEZESHKI-MODARESS, M.; ELLINI, M. R. *et al.* Optimizing Methods for Bovine Dental Pulp Decellularization. **Journal of Endodontics**, 47, n. 1, p. 62-68, 2021.

BALIC, A.; PERVER, D.; PAGELLA, P.; REHRAUER, H. *et al.* Extracellular matrix remodelling in dental pulp tissue of carious human teeth through the prism of single-cell RNA sequencing. **Int J Oral Sci**, 15, n. 1, p. 30, Aug 2 2023.

BARKAN, D.; GREEN, J. E.; CHAMBERS, A. F. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. **Eur J Cancer**, 46, n. 7, p. 1181-1188, May 2010.

BERNHARDT, A.; WEHRL, M.; PAUL, B.; HOCHMUTH, T. *et al.* Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. **PLOS ONE**, 10, n. 6, p. e0129205, 2015.

BROWN, B. N.; BARNES, C. A.; KASICK, R. T.; MICHEL, R. *et al.* Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, 31, n. 3, p. 428-437, Jan 2010.

CANDIELLO, J.; COLE, G. J.; HALFTER, W. Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. **Matrix Biol**, 29, n. 5, p. 402-410, Jun 2010.

COELHO-SAMPAIO, T.; TENCHOV, B.; NASCIMENTO, M. A.; HOCHMAN-MENDEZ, C. *et al.* Type IV collagen conforms to the organization of polylaminin adsorbed on planar substrata. **Acta Biomaterialia**, 111, p. 242-253, 2020/07/15/ 2020.

COLLIN, E. C.; GRAD, S.; ZEUGOLIS, D. I.; VINATIER, C. S. *et al.* An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy. **Biomaterials**, 32, n. 11, p. 2862-2870, Apr 2011.

COOPER, P. R.; HOLDER, M. J.; SMITH, A. J. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. **J Endod**, 40, n. 4 Suppl, p. S46-51, Apr 2014.

CORTIELLA, J.; NILES, J.; CANTU, A.; BRETTLER, A. *et al.* Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. **Tissue Eng Part A**, 16, n. 8, p. 2565-2580, Aug 2010.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, 32, n. 12, p. 3233-3243, Apr 2011.

DEBERDT, A. J.; SCHERER, S. B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. **Natureza & Conservação**, 5, n. 2, p. 31-44, 2007.

DING, G.; NIU, J.; LIU, Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-beta1. **Hum Cell**, 28, n. 2, p. 81-90, Apr 2015.

DZOBO, K.; MOTAUNG, K.; ADESIDA, A. Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. **Int J Mol Sci**, 20, n. 18, Sep 18 2019.

EFTEKHAR, M.; LEE, L.; SALAMATI, A.; LIU, Z. J. Structural characteristics of periodontal ligaments in the pig model with experimental periodontitis. **Int J Transl Sci**, 2, n. 1, 2022.

ELNAWAM, H.; ABDALLAH, A.; NOUH, S.; KHALIL, N. M. *et al.* Influence of extracellular matrix scaffolds on histological outcomes of regenerative endodontics in experimental animal models: a systematic review. **BMC Oral Health**, 24, n. 1, p. 511, Apr 30 2024.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FIORE, P. M. D.; HARTWELL, G. R. Dental Pulp Revascularization in a Replanted Avulsed Immature Maxillary Permanent Central Incisor. **Eur Endod J**, 2, n. 1, p. 1-6, 2017.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

GARCIA-ARRANZ, M.; VILLAREJO-CAMPOS, P.; BARAMBIO, J.; GARCIA GOMEZ-HERAS, S. *et al.* Toxicity study in a pig model of intraperitoneal collagenase as an "enzymatic scalpel" directed to break stroma in order to generate a new perspective for peritoneal carcinomatosis approach: an experimental research. **World J Surg Oncol**, 20, n. 1, p. 53, Feb 25 2022.

GETTY, R. S., Septimus; GROSSMAN, James Daniels. Sisson/Grossman: anatomia dos animais domésticos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1986 2 v. ISBN 9788527714389. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 9788527714389.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, 27, n. 19, p. 3675-3683, Jul 2006.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **Biomed Res Int**, 2017, p. 9831534, 2017.

GOH, S. K.; BERTERA, S.; OLSEN, P.; CANDIELLO, J. E. *et al.* Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. **Biomaterials**, 34, n. 28, p. 6760-6772, Sep 2013.

GORSCHEWSKY, O.; KLAKOW, A.; RIECHERT, K.; PITZL, M. *et al.* Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. **Am J Sports Med**, 33, n. 8, p. 1202-1209, Aug 2005.

HARGREAVES, K. M.; GIESLER, T.; HENRY, M.; WANG, Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? **J Endod**, 34, n. 7 Suppl, p. S51-56, Jul 2008.

HE, R.; CHOU, C.; CHEN, L.; STOLLER, M. *et al.* Insights Into Pulp Biomineralization in Human Teeth. **Frontiers in Dental Medicine**, Volume 3 - 2022, 2022-May-03 2022. Original Research.

HILLEBRANDT, K. H.; EVERWIEN, H.; HAEP, N.; KESHI, E. *et al.* Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transpl Int**, 32, n. 6, p. 571-585, Jun 2019.

HODDE, J.; JANIS, A.; ERNST, D.; ZOPF, D. *et al.* Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. **J Mater Sci Mater Med**, 18, n. 4, p. 537-543, Apr 2007.

HU, L.; GAO, Z.; XU, J.; ZHU, Z. *et al.* Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **Biomed Res Int**, 2017, p. 9342714, 2017.

IKEDA, H. A Morphological Study on the Cheek Tooth of the Swine. **The Journal of the Kyushu Dental Society**, 33, n. 3, p. 211-229, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E, E. **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais – 1º trimestre de 2026**. IBGE. Rio de Janeiro: 2026. 2026.

ISAEVA, E. V.; BEKETOV, E. E.; ARGUCHINSKAYA, N. V.; IVANOV SCAPITAL A, C. *et al.* Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review). **Sovrem Tekhnologii Med**, 14, n. 3, p. 57-68, 2022.

IWASA, J.; MARSHALL, W. F. **Karp's cell and molecular biology**: concepts and experiments. 9. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 364 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.; CONTOPOULOS, A. N. **Basic histology**. Los Altos: Lange Medical Publications, [19--].

LINDE, A. Dentin Mineralization and the Role of Odontoblasts in Calcium Transport. **Connective Tissue Research**, 33, n. 1-3, p. 163-170, 1995.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA, J. F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. Elsevier Brasil, 2015. 9788535283112.

MANUAL, M. S. D. V. **Eruption of the Teeth (Pig)**. 2020.

MIRMALEK-SANI, S. H.; ORLANDO, G.; MCQUILLING, J. P.; PARETA, R. *et al.* Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. **Biomaterials**, 34, n. 22, p. 5488-5495, Jul 2013.

MOHD NOOR, N. S.; LAM, X. J.; LIM, G. S.; LAU, M. N. *et al.* Acellular dental pulp and allogeneic cells for strategic pulp regeneration. **Tissue Cell**, 100, p. 103369, Jun 2026.

NAKAHARA, T.; TOMINAGA, N.; TOYOMURA, J.; TACHIBANA, T. *et al.* Isolation and characterization of embryonic ameloblast lineage cells derived from tooth buds of fetal miniature swine. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 52, n. 4, p. 445-453, Apr 2016.

NANCI, A. **Ten Cate : histologia oral : desenvolvimento, estrutura e função**. 8. ed. ed. Elsevier, 2013. 9788535264524.

NASU, M.; NAKAHARA, T.; TOMINAGA, N.; TAMAKI, Y. *et al.* Isolation and characterization of vascular endothelial cells derived from fetal tooth buds of miniature swine. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 49, n. 3, p. 189-195, Mar 2013.

O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, 26, n. 4, p. 433-441, Feb 2005.

OEHMKE, M. J.; KNOLLE, E.; OEHMKE, H. J. Lymph drainage in the human dental pulp. **Microsc Res Tech**, 62, n. 3, p. 187-191, Oct 15 2003.

OSAGO, H.; KOBAYASHI-MIURA, M.; HAMASAKI, Y.; HARA, N. *et al.* Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis. **Anal Biochem**, 548, p. 115-118, May 1 2018.

PACCOLA MESQUITA, F. C.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; MORRISSEY, J.; SAMPAIO, L. C. *et al.* Laminin as a Potent Substrate for Large-Scale Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Closed Cell Expansion System. **Stem Cells Int**, 2019, p. 9704945, 2019.

RATHINAM, E.; GOVINDARAJAN, S.; RAJASEKHARAN, S.; DECLERCQ, H. *et al.* The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 645, Jan 12 2021.

REMAGGI, G.; BARBARO, F.; DI CONZA, G.; TREVISI, G. *et al.* Decellularization Detergents As Methodological Variables in Mass Spectrometry of Stromal Matrices. **Tissue Eng Part C Methods**, 28, n. 4, p. 148-157, Apr 2022.

ROSARIO, D. J.; REILLY, G. C.; ALI SALAH, E.; GLOVER, M. *et al.* Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. **Regen Med**, 3, n. 2, p. 145-156, Mar 2008.

SANTORO, R.; CONSOLO, F.; SPICCIA, M.; PIOLA, M. *et al.* Feasibility of pig and human-derived aortic valve interstitial cells seeding on fixative-free decellularized animal pericardium. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 104, n. 2, p. 345-356, Feb 2016.

SASAKI, R.; MATSUMINE, H.; WATANABE, Y.; YAMATO, M. *et al.* Surgical procedure of extracting teeth for obtaining dental pulp for regenerative medicine in swine. **Lab Anim**, 49, n. 2, p. 172-176, Apr 2015.

SIDDIQUI, Z.; SARKAR, B.; KIM, K. K.; KADINCESME, N. *et al.* Angiogenic hydrogels for dental pulp revascularization. **Acta Biomater**, 126, p. 109-118, May 2021.

SOVA, S. S.; TJÄDERHANE, L.; HEIKKILÄ, P. A.; JERNVALL, J. A microCT Study of Three-Dimensional Patterns of Biomineralization in Pig Molars. n. 1664-042X (Print).

STERN, M. M.; MYERS, R. L.; HAMMAM, N.; STERN, K. A. *et al.* The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. **Biomaterials**, 30, n. 12, p. 2393-2399, Apr 2009.

SULLIVAN, D. C.; MIRMALEK-SANI, S. H.; DEEGAN, D. B.; BAPTISTA, P. M. *et al.* Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. **Biomaterials**, 33, n. 31, p. 7756-7764, Nov 2012.

SUN, W. Q.; LEUNG, P. Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation. **Acta Biomater**, 4, n. 4, p. 817-826, Jul 2008.

TAN, Q.; CAO, Y.; ZHENG, X.; PENG, M. *et al.* BMP4-regulated human dental pulp stromal cells promote pulp-like tissue regeneration in a decellularized dental pulp matrix scaffold. **Odontology**, 109, n. 4, p. 895-903, Oct 2021.

THESLEFF, I. Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic. **Aust Dent J**, 59 Suppl 1, p. 48-54, Jun 2014.

TRAPHAGEN, S. B.; FOURLIGAS, N.; XYLAS, J. F.; SENGUPTA, S. *et al.* Characterization of natural, decellularized and reseeded porcine tooth bud matrices. **Biomaterials**, 33, n. 21, p. 5287-5296, Jul 2012.

TREVIZANI, M.; LEAL, L. L.; FLORIANO, G. C.; MANCINI, M. C. B. *et al.* Hydrogel Based on Decellularized Bovine Trabecular Extracellular Matrix Enriched with Type I Collagen. **ACS Omega**, 10, n. 48, p. 58217-58224, Dec 9 2025.

UHL, F. E.; ZHANG, F.; POULIOT, R. A.; URIARTE, J. J. *et al.* Functional role of glycosaminoglycans in decellularized lung extracellular matrix. **Acta Biomater**, 102, p. 231-246, Jan 15 2020.

UYGUN, B. E.; SOTO-GUTIERREZ, A.; YAGI, H.; IZAMIS, M. L. *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nat Med**, 16, n. 7, p. 814-820, Jul 2010.

WEISS, J. B.; GONÇALVES, F. d. S.; MARANDUBA, C. M. d. C.; DE RESENDE, L. M. *et al.* Isolation and Characterization of Stem Cells Derived by Human Dental Pulp from Harvest Based in Rotary and Manual Techniques used in Endodontic Therapy. **Brazilian Dental Science**, 23, n. 1, 2020.

WIDBILLER, M.; ROTHMAIER, C.; SALITER, D.; WOLFLICK, M. *et al.* Histology of human teeth: Standard and specific staining methods revisited. **Arch Oral Biol**, 127, p. 105136, Jul 2021.

WOLF, M. T.; DALY, K. A.; BRENNAN-PIERCE, E. P.; JOHNSON, S. A. *et al.* A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. **Biomaterials**, 33, n. 29, p. 7028-7038, Oct 2012.

YOSHIBA, N.; EDANAMI, N.; OHKURA, N.; MAEKAWA, T. *et al.* Laminin Isoforms in Human Dental Pulp: Lymphatic Vessels Express Laminin-332, and Schwann Cell-Associated Laminin-211 Modulates CD163 Expression of M1-like Macrophages. **Immunohorizons**, 5, n. 12, p. 1008-1020, Dec 29 2021.

YU, Y.; CHAPMAN, C. Masson Trichrome Stain: Postfixation Substitutes. **Journal of Histotechnology**, 26, p. 131-134, 06/01 2003.

YUAN, S.; YANG, X.; WANG, X.; CHEN, J. *et al.* Injectable Xenogeneic Dental Pulp Decellularized Extracellular Matrix Hydrogel Promotes Functional Dental Pulp Regeneration. **Int J Mol Sci**, 24, n. 24, Dec 14 2023.

YUE, Y.; XU, W.; KAN, Y.; ZHAO, H.-Y. *et al.* Extensive germline genome engineering in pigs. **Nature Biomedical Engineering**, 5, n. 2, p. 134-143, 2021/02/01 2021.

ZHANG, W.; VAZQUEZ, B.; OREADI, D.; YELICK, P. C. Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. **J Dent Res**, 96, n. 5, p. 516-523, May 2017.

ZHANG, W.; YELICK, P. C. In vivo bioengineered tooth formation using decellularized tooth bud extracellular matrix scaffolds. **Stem Cells Transl Med**, 14, n. 2, Feb 11 2025.

APÊNDICE A – Artigo publicado “Matriz extracelular de polpa dental suína descelularizada: comparação entre dentes formados e em formação”



Decellularized swine dental pulp extracellular matrix: a comparison between formed and developing teeth

Matriz extracelular de polpa dental suína descelularizada: comparação entre dentes formados e em formação

Matriz extracelular de pulpa dental porcina descelularizada: una comparación entre dientes formados y en formación

Jairo Barros Weiss[1], Marizia Trevizani[2], Flavio Narciso Carvalho[1], Breno Valentim Nogueira[3], Érika Mageste de Almeida Candido[1], Marcos Henrique de Castro e Souza[1], Laís Lopardi Leal[2], Laura Rocha de Almeida[2], Carlos Magno da Costa Maranduba[2], Antônio Márcio Resende do Carmo[1].

ABSTRACT

Objective: To decellularize and characterize, histologically and biochemically, the extracellular matrix (ECM) of dental pulp from fully formed (M1) and developing (M2) swine molars, comparing native and decellularized tissues. **Methods:** Experimental in vitro study using coronal pulps from molars of commercially slaughtered swine, divided into M1 (erupted, with a complete root) and M2 (intraosseous, developing). An enzyme-free, Triton X-100-free protocol based on EDTA and SDS was applied. DNA and collagen were quantified, and histology (H&E, Masson's trichrome and DAPI) and scanning electron microscopy were performed; data were analysed by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p<0.05$). **Results:** Decellularization removed the cellular content of both pulps, with absence of nuclei and DNA reduction of 92.7% in M1 and 96.8% in M2 ($p<0.0001$), with no residual difference between groups ($p=0.60$). M2 pulps, collected from the maxilla only, showed a greater yield per tooth (1.173 g versus 0.377 g) and maintained stable collagen. A porous extracellular matrix scaffold was observed in both groups, with mineralized deposits suggestive of intrinsic mineralization, exclusive to decellularized M2. **Conclusion:** The conservative protocol effectively decellularized both pulps. Teeth at distinct developmental stages provide ECM with particular characteristics, which is relevant to scaffold selection in regenerative endodontics.

Keywords: Extracellular matrix, Regenerative endodontics, Dental pulp, Swine.

RESUMO

Objetivo: Descelularizar e caracterizar, histológica e bioquimicamente, a matriz extracelular (MEC) da polpa de molares suínos formados (M1) e em formação (M2), comparando tecidos nativos e descelularizados. **Métodos:** Estudo experimental in vitro com polpas coronárias de molares suínos de abate comercial, divididas em M1 (irrompidos, com raiz formada) e M2 (intraósseos, em formação). Aplicou-se protocolo livre de enzimas e de Triton X-100, à base de EDTA e SDS. Realizaram-se quantificação de DNA e de colágeno, histologia (H&E, Tricrômico de Masson e DAPI) e microscopia eletrônica de varredura, com ANOVA de uma via e post-hoc de Tukey ($p<0,05$). **Resultados:** A descelularização removeu o conteúdo celular de ambas as polpas, com ausência de núcleos e redução do DNA de 92,7% em M1 e 96,8% em M2 ($p<0,0001$), sem diferença

[1] Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), School of Dentistry, Juiz de Fora - MG.
[2] Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Institute of Biological Sciences, Juiz de Fora - MG.
[3] Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Carlos Alberto Redins Cell Ultrastructure Laboratory (LUCCAR), Vitória - ES.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors declare no conflict of interest.

SUBMETIDO EM: 7/2026 | ACEITO EM: 7/2026 | PUBLICADO EM: 8/2026

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

residual entre os grupos (p=0,60). As polpas M2, coletadas apenas da maxila, renderam maior massa por dente (1,173 g contra 0,377 g) e mantiveram o colágeno estável. Observou-se arcabouço poroso em ambos os grupos, com incrustações mineralizadas **Conclusão:** O protocolo conservador descelularizou eficazmente ambas as polpas. Dentes em estágios distintos de desenvolvimento fornecem MEC com características próprias, relevantes para a seleção do arcabouço em endodontia regenerativa.

Palavras-chave: Matriz extracelular, Endodontia regenerativa, Polpa dentária, Suínos.

RESUMEN

Objetivo: Descelularizar y caracterizar, histológica y bioquímicamente, la matriz extracelular (MEC) de la pulpa de molares porcinos formados (M1) y en formación (M2), comparando tejidos nativos y descelularizados. **Métodos:** Estudio experimental in vitro con pulpas coronarias de molares porcinos de matadero comercial, divididas en M1 (erupcionados, con raíz formada) y M2 (intraóseos, en formación). Se aplicó un protocolo libre de enzimas y de Triton X-100, a base de EDTA y SDS. Se realizaron cuantificación de ADN y de colágeno, histología (H&E, Tricrómico de Masson y DAPI) y microscopía electrónica de barrido, con ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey (p<0,05). **Resultados:** La descelularización eliminó el contenido celular de ambas pulpas, con ausencia de núcleos y reducción del ADN del 92,7% en M1 y del 96,8% en M2 (p<0,0001), sin diferencia residual entre los grupos (p=0,60). Las pulpas M2, recolectadas solo del maxilar, rindieron mayor masa por diente (1,173 g frente a 0,377 g) y mantuvieron el colágeno estable. Se observó un andamio poroso en ambos grupos, con incrustaciones mineralizadas exclusivas de M2 descelularizado. **Conclusión:** El protocolo conservador descelularizó eficazmente ambas pulpas. Los dientes en etapas distintas de desarrollo proporcionan MEC con características propias, relevantes para la selección del andamio en endodoncia regenerativa.

Palabras clave: Matriz extracelular, Endodoncia regenerativa, Pulpa dental, Porcinos.

INTRODUCTION

Tissue engineering depends on scaffolds that provide three-dimensional support to cells and reproduce the microenvironment of the target tissue (ALKSNE M, et al., 2022; REMAGGI G, et al., 2022). Decellularization of native tissues generates extracellular matrix (ECM) scaffolds with reduced immunogenicity (STERN MM, et al., 2009), capable of hosting cells for regenerative medicine, with or without recellularization, and of serving as a basis for hydrogels and bioinks (CRAPO PM, et al., 2011).

The quality of a decellularized scaffold depends on the balance between removing the cellular material, which is responsible for the recipient's immune response, and preserving the three-dimensional architecture together with the structural and signalling components of the matrix, such as collagens, laminins and glycosaminoglycans. Aggressive protocols remove DNA easily but degrade the matrix and compromise cell adhesion and differentiation during recellularization; conservative protocols preserve the matrix better but require objective demonstration that cell removal was effective (CRAPO PM, et al., 2011).

ECM-derived products of animal origin are already used clinically in soft-tissue, bone and cardiac reconstruction. Hydrogels made from natural proteins have attracted interest for their biocompatibility and their capacity to reproduce functional properties of the ECM (DING G, et al., 2015; TREVIZANI M, et al., 2025). Dental pulp, besides being a source of stem cells (WEISS JB, et al., 2020), may serve as a scaffold for tissue engineering; laminin, a natural constituent of the pulp, is a precursor of polylaminin hydrogels with reported regenerative applications in neural lesions (COELHO-SAMPAIO T, et al., 2020).

In endodontic practice, pulp trauma before complete root formation compromises tooth development, resulting in short roots with thin walls and a poorer prognosis. Revitalization and revascularization therapies have been described with success, which makes materials capable of favouring new pulp formation desirable (KHURSHID Z, et al., 2022). Swine dental pulp is widely discarded at slaughter and is therefore an abundant, low-cost source, free from the ethical dilemmas and volume limitations associated with obtaining human pulp. Few dental pulp matrices have been described (ALQAHTANI Q, et al., 2018), there is no gold standard

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

decellularization protocol (ELNAWAM H, et al., 2024) and studies comparing pulps at different developmental stages are practically non-existent. The developing pulp differs from the mature pulp not only in cellularity but also in the composition and organization of its extracellular matrix, which may translate into scaffolds with distinct structural and biological properties after.

METHODS

This is an experimental in vitro study, descriptive and comparative, with a 2 × 2 factorial design crossing tooth type (M1, erupted permanent molar with a formed root; M2, developing intraosseous molar) and tissue condition (native and decellularized), totalling four experimental groups: native M1, decellularized M1, native M2 and decellularized M2. All stages were carried out at the Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), except scanning electron microscopy, performed at the Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Ethical considerations and material sourcing

Fresh swine hemiarches were obtained, under institutional authorization, from certified slaughterhouses in Juiz de Fora-MG, Brazil. The material consisted exclusively of by-products of animals slaughtered as the commercial routine of the establishment, under official sanitary inspection for human consumption, with no breeding, housing or experimental intervention involving live animals for the purposes of this study. Animal Use Ethics Committee (CEUA) review was therefore not required according to the applicable institutional/legal framework, namely Brazilian Law No. 11,794/2008, known as the Arouca Law (MARQUES RG, et al., 2009). The animals were of commercial crossbred Duroc-based genetics, with a mean age of approximately 180 days according to supplier information; their exact genetic composition and chronological age were not recorded.

Pulp collection

The hemimandibles were disarticulated from the maxilla. Teeth were sectioned mesiodistally with a carborundum disc mounted on a straight handpiece, without reaching the pulp; the crown was then detached from the root portion, exposing the coronal pulp, which was collected with surgical forceps and curettes. M1 pulps (erupted permanent molars with a formed root) were obtained from both maxilla and mandible. M2 pulps (developing, intraosseous molars) were obtained from the maxilla only and required removal of the bone plate with forceps and chisel. The material was washed in cold saline solution, stored in 50 mL Falcon tubes and frozen. Pulps from 13 pigs were used, corresponding to 12.5 heads, since only one hemiarch was obtained from one of the animals; pulps were collected randomly from different animals. Two groups were defined: M1 (pulps from erupted, fully formed permanent molars) and M2 (pulps from developing molars impacted in bone).

Decellularization protocol

Incubation was carried out in 0.1% EDTA with 10 mM Tris for 2 h under agitation; three washes in PBS (10 min each); overnight incubation in 0.1% SDS with 10 mM Tris under agitation; a further series of PBS washes (3 × 10 min); and overnight maintenance in PBS with streptomycin. The protocol is free of enzymes (nucleases) and of Triton X-100.

DNA quantification

From approximately 50 mg (dry weight) of each group (n=3), DNA was extracted with lysis solution (10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.1% SDS, pH 8.0), maceration in a Tissue Lyser II (Qiagen), proteinase K digestion (55 °C, overnight), phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction (25:24:1) and precipitation with ammonium acetate/ethanol. Integrity was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and quantification by spectrophotometry (NanoDrop 2000, 260/280 nm).

Collagen quantification

Collagen content was determined by hydroxyproline assay (n=3), using a modified hydrolysis method: 10 mg (dry weight) hydrolysed in 9 N HCl at 100 °C for 15 h; reaction with chloramine-T and Ehrlich's reagent; reading at 550 nm. Collagen content was calculated considering hydroxyproline as 14.3%, with a standard curve from 0 to 10 µg/mL.

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Histological characterization

Paraffin-embedded tissues were sectioned at 3 µm at three depths. For H&E, Harris haematoxylin (40 s) and eosin (1 min) were used. Masson's trichrome followed the standard protocol. For DAPI, 4 µm sections obtained in a cryostat were stained and observed under a fluorescence microscope (Olympus BX51).

Scanning electron microscopy

Two decellularized and two native pulps from each group were analysed (n=8). Fixation was performed in 2.5% glutaraldehyde with 2% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer; post-fixation in 1% osmium tetroxide with potassium ferrocyanide; dehydration in ethanol; critical point drying; and gold-palladium sputter coating. Observation was carried out using a JEOL JSM-6610LV scanning electron microscope.

Statistical analysis

DNA and collagen data (n=3 per group) were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (HSD) for multiple comparisons among the four groups. The significance level adopted was $p<0.05$. GraphPad Prism software was used for the statistical analysis.

RESULTS

Yield and anatomy

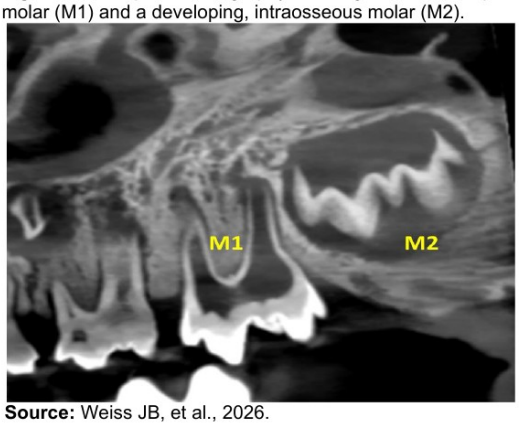
Considering the teeth available for collection in a single piece from slaughter, the mean weight per pulp was 1.173 g in M2 and 0.377 g in M1 — about 211% greater in M2 (**Table 1**). Because M2 teeth were collected from the maxilla only, the number of teeth entered in **Table 1** was adjusted accordingly (25 M2 teeth against 50 M1 teeth for the same 12.5 heads), so that yield is expressed as mean weight per pulp, normalized to the teeth actually collected in each group, and the two groups remain directly comparable on a per-pulp basis; the restriction to maxillary teeth is nevertheless acknowledged as a limitation. Computed tomography confirmed that M2, even without complete crown formation, is larger than M1 in the mesiodistal and buccopalatal dimensions (**Figure 1**).

Table 1 - Native pulp yield per tooth type, by total weight and mean weight per pulp.

Tooth type	Heads / teeth collected	Total weight	Mean weight per pulp
M1	12.5 heads / 50 teeth	18.87 g	0.377 g
M2*	12.5 heads / 25 teeth	29.32 g	1.173 g

*M2 pulps were collected from the maxilla only; the number of teeth used as the denominator was adjusted accordingly, so that the mean weight per pulp remains directly comparable between groups. **Source:** Weiss JB, et al., 2026.

Figure 1 - Computed tomography showing a formed, erupted molar (M1) and a developing, intraosseous molar (M2).



Source: Weiss JB, et al., 2026.

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Macroscopically, native pulps from both groups had a reddish colour and a gelatinous consistency. After the protocol, both groups became milky white and translucent, retaining the original shape of the pulp chamber, a change consistent with removal of the cellular and blood content.

DNA quantification

DNA quantification (ng/mg dry weight; n=3; mean ± SEM) differed significantly among groups (one-way ANOVA, p<0.0001; **Figure 2**): native M1 102.95 ± 0.61; decellularized M1 7.56 ± 1.37; native M2 302.76 ± 1.67; and decellularized M2 9.64 ± 0.49.

Decellularization significantly reduced DNA content in both pulp types (Tukey, p<0.0001), by 92.7% in M1 and 96.8% in M2, confirming effective cell removal. In native tissues, M2 showed about 2.9 times more DNA than M1 (p<0.0001), consistent with a younger and more cellularized tissue. After decellularization, M1 and M2 did not differ from each other (7.56 versus 9.64 ng/mg; p=0.60), indicating that, despite very different initial DNA loads, the protocol brought both to the same low residual level.

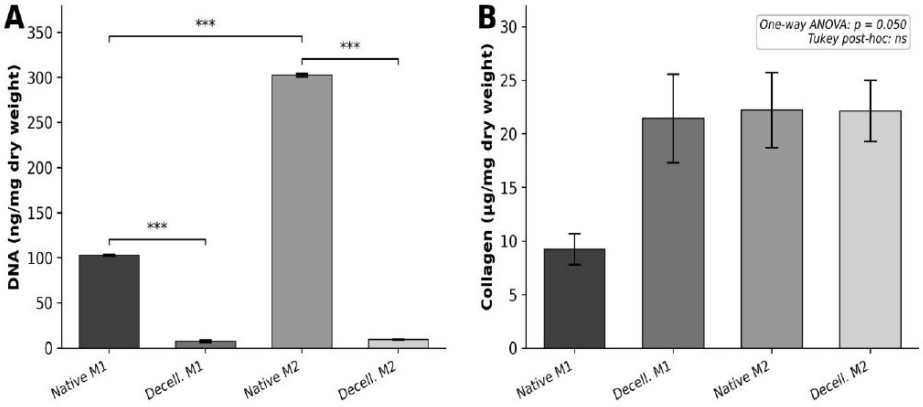
Collagen quantification

Collagen content (µg/mg dry weight; n=3; mean ± SEM) was 9.25 ± 1.45 in the native M1 group, 21.45 ± 4.14 in decellularized M1, 22.24 ± 3.52 in native M2 and 22.15 ± 2.84 in decellularized M2 (**Figure 2**). The one-way ANOVA did not reach the significance level adopted in this study ($F(3,8)=4.08$; $p=0.050$, against $\alpha=0.05$), and Tukey's post-hoc test identified no statistically significant differences among groups (all $p>0.05$). A trend towards increased collagen content was observed in M1 pulps after decellularization (approximately 132%), whereas M2 pulps maintained similar values before and after processing.

Native M2 pulps showed higher mean collagen content than native M1 pulps, although this difference was also not significant.

The increase observed in M1 probably reflects the relative enrichment of the collagenous fraction resulting from removal of cellular components and non-collagenous proteins during decellularization, rather than additional collagen synthesis. These results should therefore be interpreted as a trend, whose confirmation depends on studies with a larger sample size.

Figure 2 - Biochemical quantification of native and decellularized groups (M1 and M2). (A) DNA (ng/mg dry weight): one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test; ***p<0.0001; the two decellularized groups did not differ (p=0.60). (B) Collagen (hydroxyproline assay; µg/mg dry weight): one-way ANOVA p=0.050; Tukey's post-hoc test not significant (ns). Data presented as mean ± SEM, n=3.



Source: Weiss JB, et al., 2026.

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

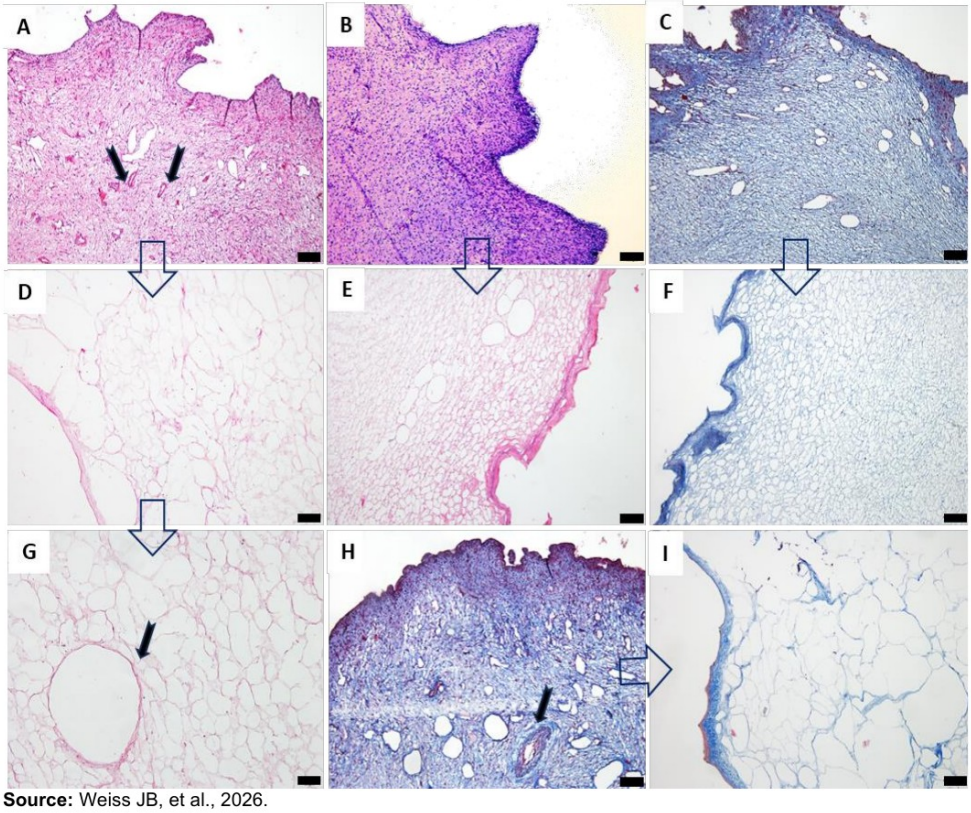
Histology

Histological characterization by H&E and Masson's trichrome is shown in **Figure 3**. Nuclei were abundant in the native panels and minimal to absent in the decellularized panels, corroborating the cell removal also evidenced by DNA quantification and confirmed by DAPI fluorescence (**Figure 4**).

The tissue network was better preserved in decellularized M2. A notable difference was observed in the vascular component between the two developmental stages: native M1 showed distinct blood vessels lined by stained endothelial cells, whereas native M2 showed immature vascular structures, still forming and not lined by endothelial cells.

This difference is consistent with the developmental stage of each tooth and may be relevant to the angiogenic potential of the resulting scaffold. In M2, H&E.

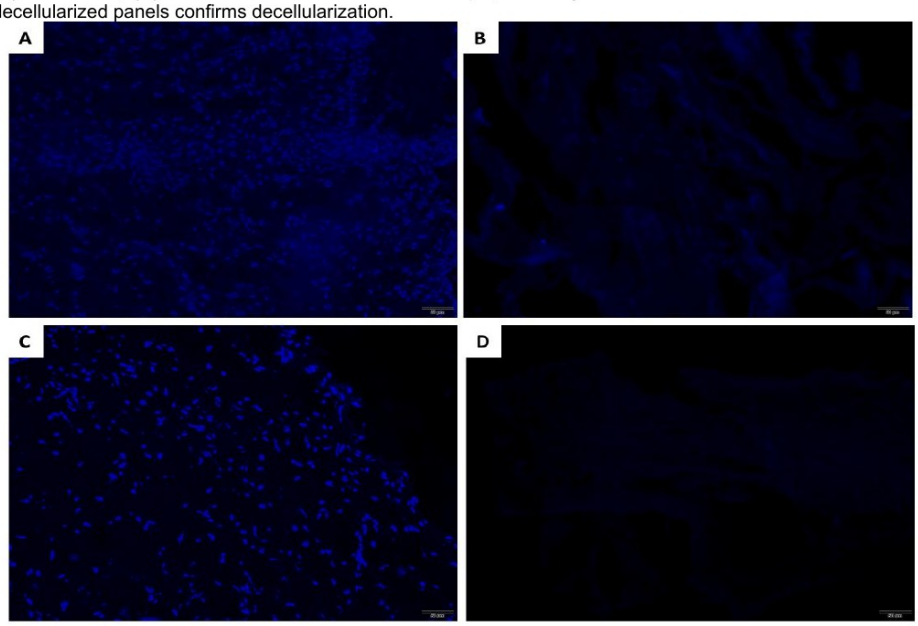
Figure 3 - Histological characterization. Open arrows indicate the directly related image. (A) H&E, native M1 - black arrows highlight blood vessels lined by endothelial cells; (B) H&E, native M2 - immature or forming vasculature, not lined by endothelial cells; (C) Masson's trichrome, native M2; (D) H&E, decellularized M1; (E) H&E, decellularized M2; (F) Masson's trichrome, decellularized M2; (G) H&E, decellularized M2, highlighting the preservation of a blood vessel structure; (H) Masson's trichrome, native M1 - arrows highlight blood vessels; (I) Masson's trichrome, decellularized M1. The absence of nuclei in the decellularized panels confirms decellularization. Scale bars 100 µm; 10x magnification (except field G, 20x, 50 µm).



Source: Weiss JB, et al., 2026.

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

Figure 4 - Fluorescence microscopy (DAPI) of the experimental groups. (A) native M1; (B) decellularized M1; (C) native M2; (D) decellularized M2. Scale bar 50 µm; 20x objective. The absence of nuclei in the decellularized panels confirms decellularization.

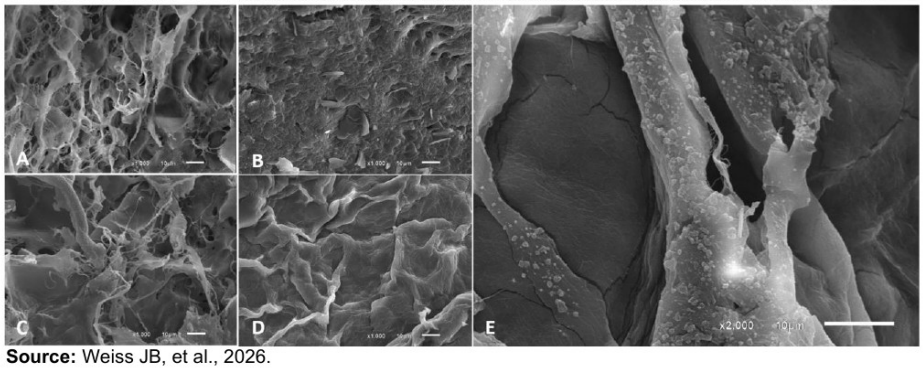


Source: Weiss JB, et al., 2026.

Scanning electron microscopy

Both decellularized groups showed a porous scaffold with efficient cell removal. Native M2 pulps showed crystalline structures suggestive of mineralization intrinsic to tooth formation, and mineralized deposits were observed exclusively in the decellularized M2 group, absent in the other groups (**Figure 5**).

Figure 5 - Scanning electron microscopy. (A) native M2; (B) decellularized M2; (C) native M1; (D) decellularized M1, scale bar 10 µm, 1,000× magnification. (E) Detail of the mineralized deposits remaining in the decellularized M2 group, observed exclusively in this group, scale bar 10 µm, 2,000× magnification.



Source: Weiss JB, et al., 2026.

Revista Eletrônica Acervo Saúde | ISSN 2178-2091

DISCUSSION

The choice of swine pulp is supported by the availability of the material, a by-product of large-scale slaughter worldwide, and by the anatomical and genetic proximity between pigs and humans (EFTEKHAR M, et al., 2022). The well-established use of porcine tissues in xenotransplantation supports further research on these tissues (YUE Y, et al., 2021).

In contrast to Bakhtiar H, et al. (2021), who worked with bovine pulp, the present study used swine pulp, which may add knowledge for the manufacture of hydrogels and scaffolds. Tomographic examination showed that collecting M2 from the mandible is also possible. However, mandibular bone is naturally much harder than maxillary bone, and upper M2 teeth are embedded in trabecular bone, which is easier to access. M2 pulps were collected from the maxilla only.

This restriction was accounted for arithmetically in **Table 1**, in which yield is expressed as mean weight per pulp and is therefore normalized to the number of teeth actually collected in each group, so that the M1-M2 comparison is not distorted by the different number of teeth obtained per head. Even so, the absence of mandibular M2 teeth remains a limitation, since possible maxillary-mandibular differences in pulp volume and composition at this developmental stage were not assessed.

The absence of a gold standard decellularization protocol is well documented: the systematic review by Elnawam H, et al. (2024) pointed to methodological heterogeneity and high risk of bias across studies. A conservative protocol was chosen, with low-concentration SDS, without Triton X-100 and without nucleases, in order to preserve collagen and laminin. Triton was avoided because of its residual cytotoxicity and its potential to degrade ECM components (GILPIN A e YANG Y, 2017).

Not using nucleases did not compromise DNA removal, which was achieved in both groups. Few studies have evaluated tooth germ pulp; Traphagen SB, et al. (2012) worked with porcine M2 and M3 tooth buds but did not compare developmental stages or fully formed tissues, and their demineralization protocol may have erased mineralization signals in the dental pulp, such as those observed here.

Studies using porcine tooth buds for complete tooth regeneration preserved ECM gradients and demonstrated recellularization and formation of dental tissues in vivo, but did not characterize the decellularized pulp of these tooth germs in detail, which is the focus of the present work (ZHANG W, et al., 2009).

Differences between M1 and M2 in the response to decellularization may relate to vascular architecture. In cat canines, vessels occupy about 14.4% of the coronal pulp area, reaching 42.9% in the pulp core (VONGSAVAN N e MATTHEWS B, 1992). No specific studies on vascularization in pigs were found. One hypothesis is that the greater vascular organization observed in M1 favoured diffusion of the decellularizing solutions into deeper regions of the tissue.

Histological analysis confirmed this contrast in vascular maturity: M1 pulps contained distinct blood vessels lined by endothelial cells, whereas M2 pulps showed immature vasculature still forming and not endothelialized.

This contrast reflects the developmental stage of each tooth. The more mature vascular structures in M1 may represent a relevant feature for future recellularization and angiogenesis strategies; however, this hypothesis depends on confirmation by functional assays, including endothelial immunostaining, recellularization tests and evaluation of the cellular response on the matrix.

The mineralized deposits exclusive to M2 are consistent with active mineralization during tooth formation: the mature pulp ECM is normally non-mineralized, but pulp cells can regulate mineralization under stimulus, with hydroxyapatite deposition associated with type I collagen, closer to the forming crown (LINDE A, 1995).

Although compositional analysis, for example by EDS, was not performed, the morphology observed in the M2 group is consistent with mineralized deposits described previously (HE R, et al., 2022). Scaffold pore size plays a direct role in cell adhesion during recellularization, since each cell type has an ideal size range for efficient adhesion to the scaffold (O'BRIEN FJ, et al., 2005).

Excessively porous scaffolds or those with matrix degradation tend to compromise this adhesion. The porosity of the matrices obtained in this study was not quantified, a step necessary to define the most appropriate recellularization strategy for each pulp type.

The mineralization observed in native M2 can be interpreted in the light of mechanisms already described for pulp tissue. Growth factors and cytokines produced by pulp cells themselves regulate mineralization even outside pathological contexts (COOPER PR, et al., 2014), and mechanical tension in fibronectin fibres is known to directly regulate osteogenesis of mesenchymal stem cells, with more stretched fibres favouring mineralizing differentiation (LI B, et al., 2013).

Calcium availability in the microenvironment has been identified as a determining factor in the differentiation of pulp stem cells (RATHINAM E, et al., 2021). The mineralized deposits observed in M2 may be relevant for applications in mineralized tissues or at the dentin-pulp interface, but their influence on cell adhesion, differentiation and the formation of functional pulp tissue still needs to be investigated.

DNA quantification showed reductions of 92.7% in M1 and 96.8% in M2, close to those reported for effective decellularization, for example around 99.5% in Wolf MT, et al. (2012), although the present values were obtained with a more conservative, nuclease-free protocol.

The convergence of both groups to low residual DNA levels, regardless of the initial differences in cellularity, reinforces the reproducibility and effectiveness of the protocol. Widely cited criteria for decellularization suggest residual DNA below 50 ng/mg dry weight (CRAPO PM, et al., 2011), a threshold reached in both groups.

The relative increase in collagen after decellularization was also reported by Yuan S, et al. (2023). Here, the mean rose from 9.3 to 21.5 µg/mg, following this pattern, although without statistical significance in the post-hoc test, which probably reflects the small sample size and the variability between replicates. The macroscopic appearance, with a change from red to translucent milky white, was consistent with previous reports (TAN Q, et al., 2021).

From an applied standpoint, the choice between the two matrix types depends on the objective of the intended regenerative strategy. The greater yield per tooth in M2, even when restricted to maxillary teeth, favours protocols that demand a large volume of material, such as the production of ECM-derived hydrogels and bioinks, in which yield per collected unit has a direct impact on process viability.

The mature, endothelialized vascular architecture observed in M1, in turn, may be advantageous when the aim is to reproduce a pre-formed vascular bed that guides neoangiogenesis after implantation. This distinction only becomes evident when pulps from different stages are processed under the same protocol, a comparison that had not been described in the literature consulted.

A further practical implication concerns the logistics of obtaining the material. Because M2 molars are intraosseous, their collection requires removal of the bone plate and is therefore more laborious and slower than the collection of erupted M1 molars, even though the yield per tooth is substantially higher. In routine slaughterhouse conditions, where processing time is limited, this trade-off between yield and collection effort should be considered when planning the scale of scaffold production.

The results suggest that the developmental stage of the tooth influences not only the initial cellularity of the pulp but also the organization of the extracellular matrix. M2 showed greater tissue volume, greater cellularity and preservation of collagen content after decellularization.

These differences indicate that matrices obtained from teeth at different developmental stages may present distinct biological properties, an aspect relevant to future applications in regenerative endodontics and tissue engineering.

This study has five main limitations. First, the exact genetic composition and chronological age of the animals were not recorded, which restricts the control of potentially relevant biological variables. Second, M2 pulps were collected from the maxilla only; this was accounted for arithmetically in the calculation of mean weight per pulp (**Table 1**), but possible maxillary-mandibular differences in pulp.

CONCLUSION

The conservative, enzyme-free protocol was effective in decellularizing pulps from fully formed (M1) and developing (M2) swine molars, producing a marked reduction in residual DNA and preserving a porous extracellular matrix scaffold. M2 pulps, collected from the maxilla only, showed greater yield per tooth, higher initial cellularity and mineralized deposits, whereas M1 pulps showed more mature vascularization. These findings indicate that the developmental stage of the tooth should be considered in the selection of matrices for future applications in regenerative endodontics. However, additional studies of porosity, mineral composition, recellularization and implantation are necessary to confirm the functional potential of these scaffolds.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

The authors thank the Carlos Alberto Redins Cell Ultrastructure Laboratory (LUCCAR), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), for the scanning electron microscopy analyses. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

DECLARATION ON THE USE OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE

During the preparation of this manuscript, the authors used an artificial intelligence tool (Claude, Anthropic) to assist in drafting, reviewing and formatting parts of the text. The authors reviewed and edited all generated content and take full responsibility for the accuracy and integrity of the manuscript.

REFERENCES

1. ALKSNE M, et al. Dental pulp stem cell-derived extracellular matrix: autologous tool boosting bone regeneration. Cytotherapy, 2022; 24(6): 597-607.
2. ALQAHTANI Q, et al. Decellularized swine dental pulp tissue for regenerative root canal therapy. Journal of Dental Research, 2018; 97(13): 1460-1467.
3. BAKHTIAR H, et al. Optimizing methods for bovine dental pulp decellularization. Journal of Endodontics, 2021; 47(1): 62-68.
4. COELHO-SAMPAIO T, et al. Type IV collagen conforms to the organization of polylaminin adsorbed on planar substrata. Acta Biomaterialia, 2020; 111: 242-253.
5. COOPER PR, et al. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. Journal of Endodontics, 2014; 40(4 Suppl): S46-S51.
6. CRAPO PM, et al. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials, 2011; 32(12): 3233-3243.
7. DING G, et al. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-beta1. Human Cell, 2015; 28(2): 81-90.
8. EFTEKHAR M, et al. Structural characteristics of periodontal ligaments in the pig model with experimental periodontitis. International Journal of Translational Science, 2022; 2(1).
9. ELNAWAM H, et al. Influence of extracellular matrix scaffolds on histological outcomes of regenerative endodontics in experimental animal models: a systematic review. BMC Oral Health, 2024; 24(1): 511.
10. GILPIN A e YANG Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. BioMed Research International, 2017; 2017: 9831534.
11. HE R, et al. Insights into pulp biomineralization in human teeth. Frontiers in Dental Medicine, 2022; 3.
12. KHURSHID Z, et al. Future of decellularized dental pulp matrix in regenerative endodontics. European Journal of Dentistry, 2022; 16(4): 737-741.
13. LI B, et al. Mesenchymal stem cells exploit extracellular matrix as mechanotransducer. Scientific Reports, 2013; 3: 2425.

14. LINDE A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. Connective Tissue Research, 1995; 33(1-3): 163-170.
15. MARQUES RG, et al. Brazilian law for scientific use of animals. Acta Cirurgica Brasileira, 2009; 24(1): 69-74.
16. O'BRIEN FJ, et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterials, 2005; 26(4): 433-441.
17. RATHINAM E, et al. The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome. Scientific Reports, 2021; 11(1): 645.
18. REMAGGI G, et al. Decellularization detergents as methodological variables in mass spectrometry of stromal matrices. Tissue Engineering Part C: Methods, 2022; 28(4): 148-157.
19. STERN MM, et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. Biomaterials, 2009; 30(12): 2393-2399.
20. TAN Q, et al. BMP4-regulated human dental pulp stromal cells promote pulp-like tissue regeneration in a decellularized dental pulp matrix scaffold. Odontology, 2021; 109(4): 895-903.
21. TRAPHAGEN SB, et al. Characterization of natural, decellularized and reseeded porcine tooth bud matrices. Biomaterials, 2012; 33(21): 5287-5296.
22. TREVIZANI M, et al. Hydrogel based on decellularized bovine trabecular extracellular matrix enriched with type I collagen. ACS Omega, 2025; 10(48): 58217-58224.
23. VONGSAVAN N, MATTHEWS B. The vascularity of dental pulp in cats. Journal of Dental Research, 1992; 71(12): 1913-1915.
24. WEISS JB, et al. Isolation and characterization of stem cells derived by human dental pulp from harvest based in rotary and manual techniques used in endodontic therapy. Brazilian Dental Science, 2020; 23(1).
25. WOLF MT, et al. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. Biomaterials, 2012; 33(10): 2916-2925.
26. YUAN S, et al. Injectable xenogeneic dental pulp decellularized extracellular matrix hydrogel promotes functional dental pulp regeneration. International Journal of Molecular Sciences, 2023; 24(24).
27. YUE Y, et al. Extensive germline genome engineering in pigs. Nature Biomedical Engineering, 2021; 5(2): 134-143.
28. ZHANG W, et al. Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. Methods, 2009; 47(2): 122-128.