

Estabelecimento de um protocolo para a descelularização do tecido pulpar: um estudo piloto

TIANO IRIGARAY GONZALEZ¹; BHÁRBARA MARINHO BARCELLOS²; SARAH ARANGUREM KARAM³; JÚLIO CA⁴; LUIZ ALEXANDRE CHISINI⁵; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tianoiggy@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bharbarambarcellos@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – sarahkaram_7@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cajulio125@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – luizalexandrechisini@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O tecido pulpar (TP) tem uma função dinâmica e adaptativa permitindo ao dente que não seja apenas um artefato mecanicamente isolado, mas uma peça biomecânica integrada às funções estomatognáticas do ser humano, que incluem mastigação e deglutição, na harmonia do complexo de manutenção crânio facial para a respiração, sucção e fonação. Com o advento da engenharia tecidual (ET), estudos vêm ganhando, a cada dia, mais perspectivas quanto ao reparo de tecidos injuriados, degenerados ou até mesmo no sentido de sua reativação.

A ET associa conhecimentos de áreas, como engenharia e ciências biológicas e tem como objetivo induzir a regeneração da estrutura e da função do tecido de interesse (LANGER & VACANTI, 1993). Tal área do conhecimento se baseia em três pilares fundamentais: as células tronco; os fatores de crescimento e os *scaffolds*. Os últimos compreendem estruturas tridimensionais porosas que permitem a difusão de nutrientes para células e fornecem suporte mecânico adequado durante o processo de regeneração (DEMARCO et al., 2011).

Os *scaffolds* devem se caracterizar como análogos à matriz extracelular (MEC) por um período de tempo finito (DEMARCO, 2011). A MEC é um complexo molecular composto por uma ampla gama de moléculas que possuem função estrutural e/ou biológica (RAVINDRAN & GEORGE, 2015). Dentre essas moléculas é possível encontrar colágeno, glicoproteínas, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elastinas (HANSEN et al., 2015), sendo que em cada tecido estes componentes apresentam uma distribuição espacial e quantitativa extremamente complexa e única (BADYLAK et al., 2009). Além de oferecer suporte para adesão celular, a MEC também atua como sítio de ancoragem de moléculas bioativas como fatores de crescimento, enzimas e citocinas (RAVINDRAN & GEORGE, 2015). Tecidos ou órgãos descelularizados podem servir como fontes de MEC biológica para engenharia de tecidos, o grau relativamente elevado de conservação de vários componentes da matriz extracelular permite que sua utilização (RAVINDRAN & GEORGE, 2015). Assim, um dos principais desafios na

utilização de tecidos como scaffolds para, reside na escolha de um modelo animal e na descelularização apropriado (LUMPKINS, 2008). Neste contexto, após a seleção do modelo animal, um método de descelularização apropriado deve ser aplicado para preparar o scaffold. Diante do exposto, O objetivo desse estudo foi avaliar, através de microscopia ótica (MO), a influência sobre a manutenção da integridade estrutural da MEC do TP submetidos a duas soluções descelularizantes (SD).

2. METODOLOGIA

Incisivos suínos foram obtidos mediante doação de um abatedouro local. No dia agendado para o abate, dois pesquisadores responsáveis pelo presente estudo foram até o frigorífico para que o material biológico de interesse pudesse ser imediatamente armazenado para ser enviado em condições próprias ao ambiente laboratorial. Os dentes foram armazenados e transportados em uma solução de 10% DMEM e 1% penicilina/estreptomicina (4°C) submetidos a uma temperatura de 4°C. No laboratório os dentes foram devidamente dissecados para remoção de qualquer remanescente de tecido ósseo ou periodontal que pudesse estar aderido à superfície radicular. Após vigorosa descontaminação das superfícies mineralizadas com álcool etílico a 70%, os dentes foram levados à capela de fluxo laminar e seccionados longitudinalmente com o auxílio de um fórceps cirúrgico.

O TP foi cuidadosamente removido do canal radicular com a utilização de curetas de dentina previamente esterilizadas e então acondicionado em placas de Petri, nas quais foi submetido a um vigoroso processo de lavagem com a utilização de 20ml de Tampão Salino (PBS 1X) para remoção de possíveis debris remanescentes do processamento do tecido. As polpas obtidas foram alocadas em dois grupos experimentais de acordo com a SD, como segue: S1: NaCl (50ml); S2: Tripsina-EDTA 0,25% (50ml). Em ambos grupos experimentais, cada TP foi acondicionado em um copo Becker de 100ml, ao qual foi adicionado 50ml de uma das SD. O conjunto foi levado a uma estufa onde foi mantido a 37°C durante 48 horas. Após o período determinado para a descelularização tecidual, os TP foram removidos da SD e lavados ativamente com 100ml de tampão salino (PBS) por cinco vezes num período de 1h. Findada a lavagem, as matrizes descelularizadas foram imediatamente encaminhadas ao Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia – UFPel, onde foram submetidos à técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) para avaliação estrutural da MEC por MO. Após microtomia realizada a 3µm de espessura, os cortes foram desparafinizados e reidratados. Foram procedidas então, a desidratação, diafanização e montagem em Permount® das secções histológicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo de um protocolo de descelularização é remover eficientemente todo o material celular e nuclear, minimizando qualquer efeito adverso sobre a composição, atividade biológica e a integridade estrutural da matriz extracelular

remanescente (RAVINDRAN & GEORGE, 2015). Os protocolos mais sólidos e eficazes de descelularização agem por meios físicos, químicos e enzimáticos atuando sobre ligações proteína-proteína e lipídio-proteína, as quais são responsáveis pela manutenção da integridade da membrana celular bem como à adesão das células ao substrato da MEC (RAVINDRAN & GEORGE, 2015). A análise histológica demonstrou que no grupo S1, a matriz extracelular remanescente apresentou fibras colágenas em um padrão fibrilar organizado, com arranjo e estrutura preservadas indicando a presença de um arcabouço íntegro. Além disso, foi possível observar áreas acelulares permeadas por sítios onde se observava resquícios de núcleos, possivelmente de fibroblastos fusiformes e maduros. Em S2, foi mantida a orientação das fibras colágenas, entretanto, as fibras demonstram um padrão de arranjo mais frouxo e poucas áreas focais acelulares. De fato, relatos demonstram que as enzimas parecem atuar de forma mais agressiva, ou até mesmo menos seletiva, sobre os compostos fundamentais da Matriz Extracelular (LUMPKINS et al., 2008). Dessa forma, quanto menos seletivo o método utilizado para a descelularização, maior o processo de lixiviação de colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, fibronectina; fatores de crescimento como o TGF- β , FGF e VEGF, dentre outros que atuam direta ou indiretamente nas células indiferenciadas que colonizarão essa matriz direcionando seu desenvolvimento (RAVINDRAN & GEORGE, 2015).

4. CONCLUSÕES

Nesse estudo piloto pudemos observar que a solução NaCl parece ser mais efetiva e menos agressiva à MEC do tecido pulpar. Tal solução será submetida a análises adicionais para confirmar a hipótese estabelecida a partir do presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADYLAK, S.F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**. v.5, n.1, p. 1-13, 2015.
- DEMARCO, F.F.; CONDE, M. C.; CAVALCANTI, B.N.; CASAGRANDE, L.; SAKAI, V. T.; NÖR JE., Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal**, v.22, n.1, p.3-13, 2011.
- HANSEN, N. U. B.; GENOVESE, F.; LEEMING, D. J.; KARSDAL, M. A. The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 98, n. 2, p. 286-94, 2015.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-6, 1993.
- LUMPKINS, S.B., PIERRE N., MCFETRIDGE P.S. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue

engineering the temporomandibular joint disc. **Acta Biomaterialia** n.4, p.808-16, 2008.

RAVINDRAN, S.; GEORGE A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. **Frontiers in Physiology**. doi: 10.3389/fphys.2015.00118, 2015.