



MAYARA ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO *IN VITRO* DE POLPAS
DESCELULARIZADAS COMO SCAFFOLD BIOLÓGICO**

In Vitro Evaluation of Regenerative Potential of Decellularized Dental Pulps as Biological Scaffold

BRASÍLIA, 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAYARA ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO *IN VITRO* DE
POLPAS DESCELULARIZADAS COMO *SCAFFOLD* BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção de Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dra. Taia Maria Berto

Rezende

BRASÍLIA, 2025

MAYARA ALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO *IN VITRO* DE POLPAS
DESCELULARIZADAS COMO *SCAFFOLD* BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção de Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 31 de março de 2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Presidente)

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Kely Firmino Bruno

Faculdade Sul-Americana, FASAM.

Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Ana Livia Gomes Cornelho (Suplente)

Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha mãe, que não lia muito bem, mas que fez questão que eu o fizesse. A melhor professora que tive na vida, cujo empenho em me guiar pelo caminho dos estudos sempre veio em primeiro lugar. A quem interpreto, ao tempo de minha existência, como exemplo de força. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Te amo para sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende**, pela dedicação, orientação, confiança e respeito ao longo de toda esta jornada. Sua experiência, sabedoria e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sou grata por sempre estar disposta a compartilhar seu vasto conhecimento e por me incentivar a ir além.

Aos meus pais, **Meire e Edson** que com imenso esforço e dedicação, abriram mão de suas próprias vontades e sonhos para garantir que eu tivesse a oportunidade de seguir o caminho acadêmico. Sei que cada sacrifício, cada noite sem descanso e cada renúncia feita por eles foram motivados pelo desejo de me proporcionar um futuro melhor. Eles foram os pilares que sustentaram minha jornada até aqui, e sem eles, nada disso seria possível. Minha vitória é, sem dúvida, reflexo do amor e da dedicação que sempre me deram.

À minha namorada **Emilly Paloma**, minha parceira e meu braço direito. Seu apoio constante, seu amor e sua compreensão foram fundamentais para que eu seguisse em frente, especialmente nos momentos mais desafiadores. Obrigada, por me impulsionar e acreditar no meu potencial, mesmo quando eu não acreditei. Você esteve ao meu lado em cada passo, sempre me motivando e celebrando as vitórias comigo. Obrigada por toda força, amor e carinho.

Ao meu irmão **Mardison**, ele foi uma presença constante de força e motivação, me incentivando a seguir em frente nos momentos difíceis e celebrando comigo as conquistas. Sua amizade e parceria foram fundamentais em minha caminhada até aqui.

À minha dupla e parceira de laboratório, **Larissa Barbosa**, que se tornou uma grande amiga ao longo desses dois anos de trabalho conjunto. Juntas, superamos desafios e celebramos conquistas, e sua presença tornou todo o processo mais leve e gratificante. Sou imensamente grata por sua amizade, dedicação e pelo apoio dentro e fora da bancada, seu companheirismo fez toda a diferença nessa jornada.

Aos meus amigos **Tássio, Jade, Giovanna, Romildo, Patrícia, Renato e Laílla**, pelo apoio em cada etapa desta jornada. Pela companhia, pelas risadas, pelas conversas que trouxeram leveza aos dias difíceis e pelos momentos de descontração que me permitiram, ainda que por instantes, esquecer o peso dos desafios. Sou imensamente grata por ter vocês nessa

caminhada.

Aos meus colegas de laboratório **Johnny, Raquel, Maria Ester, Michel, Rubén**, pelos socorros, pela ajuda e pela força mútua ao longo de toda essa jornada. Cada gesto de apoio e colaboração fez toda a diferença. Sou grata por poder contar com pessoas tão dedicadas e dispostas a compartilhar conhecimentos e experiências. Agradeço imensamente à todo o grupo de pesquisa **Biodonto**, especialmente, os alunos de iniciação científica, **Gabriel, Natan, Júlia** e **Christlaine**, cuja dedicação, entusiasmo e empenho foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas de laboratório **Rosiane, Ingrid e Lídia**, pelo auxílio na leitura de alguns resultados da minha pesquisa. Obrigada pelo apoio e colaboração durante essa jornada.

À minha psicóloga, **Aurenir**, por me ajudar a enxergar além das dificuldades e a transformar angústias em aprendizado. Pela paciência, pelo acolhimento e por cada conversa que me trouxe clareza e força para seguir em frente.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** e toda estrutura da **Universidade de Brasília**, pela oportunidade.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia**, da **Universidade Católica de Brasília**, pelo fornecimento da estrutura e parceria na execução dos experimentos.

À **CAPES, CNPq e FAPDF** pelo auxílio financeiro e por fomentar avanços nas áreas de Ciência.

Meus sinceros agradecimentos!

“You may say I’m dreamer, but I’m not the only one.”

The Beatles

RESUMO

Terapias regenerativas utilizando arcabouços derivados da matriz extracelular descelularizada (MECd) têm demonstrado grande potencial para promover a regeneração tecidual e restaurar a vitalidade do tecido pulpar. Estudo recente identificou a permanência de proteínas-chave relacionadas ao processo regenerativo endodôntico, como a Periostina (POSTN) e Fibrilina (FBN1) em MECd por proteômica nos dois protocolos utilizados neste trabalho. A partir desses achados, este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre os tecidos de polpa dentária descelularizada (DP), obtidos por dois métodos de descelularização, e as células-tronco da polpa dentária (DPSCs). A DP foi testada em duas formas: extratos de polpa descelularizada (DPE) e polpa dentária descelularizada liofilizada (FDP). A eficiência da descelularização foi confirmada por coloração com DAPI e extração de DNA. Dois tipos de produtos de polpa descelularizada foram preparados, resultando nos grupos DPEM, DPES, FDPM e FDPS. Esses grupos foram analisados por espectrometria de massa com desorção/ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-ToF). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT e a morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A proliferação e migração das DPSCs foram avaliadas pelo teste de exclusão do azul de tripano e pelo ensaio de arranhadura (*scratch assay*), respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas por meio dos testes ANOVA e Tukey, considerando-se nível de significância de $p < 0,05$. A análise MALDI-ToF revelou diferenças significativas nos perfis proteicos entre os grupos. Embora o grupo DPEM tenha mostrado citotoxicidade inicial, com redução da viabilidade celular após 24 horas, uma recuperação significativa foi observada após 48 horas, sugerindo um efeito citotóxico transitório. A análise de MEV mostrou rupturas celulares nos grupos DPEM e DPES a 72 horas, indicando uma resposta celular inicial, mas ensaios subsequentes demonstraram recuperação celular. Todos os grupos exibiram altas taxas de migração e proliferação, com destaque para os grupos FDPM e FDPS, que apresentaram melhores resultados. Estes resultados demonstraram a alta eficácia dos produtos derivados da polpa dentária descelularizada, destacando seu papel crucial na regeneração pulpar. Embora todos os grupos tenham mostrado resultados favoráveis, os produtos de polpa dentária liofilizada (FDPS e FDPM) se destacaram com resultados superiores, exibindo melhor desempenho em comparação com o extrato de polpa dentária liofilizada. Ambos os produtos de polpa descelularizada demonstraram forte potencial para regeneração tecidual, apesar das variações observadas. Novas pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos subjacentes e as vias de sinalização envolvidas.

Palavras-chave: Regeneração pulpar; Descelularização; Matriz Extracelular; Polpa descelularizada.

ABSTRACT

Regenerative therapies using scaffolds derived from decellularized extracellular matrix (dECM) have shown great potential for promoting tissue regeneration and restoring pulp tissue vitality. A recent study identified the persistence of key proteins related to the endodontic regenerative process, such as Periostin (POSTN) and Fibrillin (FBN1), in dECM through proteomics in both protocols used in this work. Based on these findings, the aim of this study was to evaluate the interaction between decellularized dental pulp (DP) tissues, obtained through two decellularization methods, and dental pulp stem cells (DPSCs). DP was tested in two forms: decellularized pulp extracts (DPE) and lyophilized decellularized dental pulp (FDP). Decellularization efficiency was confirmed by DAPI staining and DNA extraction. Two types of decellularized pulp products were prepared, resulting in the groups DPEM, DPES, FDPM, and FDPS. These groups were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-ToF) mass spectrometry. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay, and cellular morphology was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The proliferation and migration of DPSCs were evaluated using the trypan blue exclusion test and the scratch assay, respectively. Statistical analyses were performed using ANOVA and Tukey tests, considering a significance level of $p < 0.05$. MALDI-ToF analysis revealed significant differences in the protein profiles between the groups. Although the DPEM group showed initial cytotoxicity with reduced cell viability after 24 hours, significant recovery was observed after 48 hours, suggesting a transient cytotoxic effect. SEM analysis showed cell ruptures in the DPEM and DPES groups at 72 hours, indicating an initial cellular response, but subsequent assays demonstrated cell recovery. All groups exhibited high migration and proliferation rates, with the FDPM and FDPS groups showing the best results. These results demonstrated the high efficacy of decellularized dental pulp-derived products, highlighting their crucial role in pulp regeneration. Although all groups showed favorable results, the lyophilized dental pulp products (FDPS and FDPM) stood out with superior outcomes, displaying better performance compared to the decellularized pulp extract. Decellularized pulp products showed strong potential for tissue regeneration, despite the observed variations. Further research is needed to clarify the underlying mechanisms and signaling pathways involved.

Keywords: Pulp Regeneration; Decellularization; Extracellular Matrix; Decellularized Pulp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Figure 1. A – Schematic representation of decellularization protocols using Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) and Song *et al.* (2017) published methods. B – Histological sections of human dental pulp (hDP) stained with DAPI: a-c show healthy pulp tissue containing blue, fluorescent nuclei; d-f show decellularized pulp following DPM protocol with no visible nuclei; g-i show decellularized pulp following DPS protocol with no visible nuclei. Scale bar: a-g 100 μm ; b-h 80 μm ; c-i 50 μm . C Average of DNA content (ng/mg of dry tissue) after DNA quantification using a Nanodrop spectrophotometer. **** $p < 0.0001$, represent statistical difference between groups by t-test.

Figure 2. MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight) of DPEM and DPES extracts compared to lyophilized DPs, FDPM and FDPS. (A) Graphical representation of extracts and freeze-dried decellularized pulp. (B) Reflected mode analysis, range of 750 to 3500 m/z; (C) Linear mode analysis, range of 800 to 20000 m/z.

Figure 3. A- Graphical representation of extracts and freeze-dried decellularized pulp. B— Evaluation of cell viability through metabolic activity in DPSCs in contact with extracts of decellularized dental pulp. Graphs represent the mean of MTT absorbance, in each group: DPEM, DPES, FDPM and FDPS. Values were normalized as percentages, considering control as 100% metabolic activity. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ represent statistical differences between groups by ANOVA.

Figura 4. SEM images of DPSCs in different cell conditions. A and B represent DPSCs. C— I show the morphology of hDPs following the protocol of Song *et al.* (2017), while D— J show the morphology of hDPs following the protocol of Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) K— M show the morphology of DPSCs in contact with DPES, and L— N show the morphology of DPSCs in contact with DPEM. O— Q show the morphology of DPSCs in contact with FDPS, while P— R show the morphology of DPSCs in contact with the FDPM.

Figure 5. Migration (A) and proliferation (B) rates of hDPSCs in contact with DPEM, DPES, FDPM and FDPS. Graphs were expressed as mean of technical and biological triplicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, represent significant differences between groups by ANOVA test. C— Representative images of hDPSCs in different conditions. Yellow dots denote the presence of cells within the wound.

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO.

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais utilizados para avaliar o efeito da descelularização da polpa dentária.

CAPÍTULO 1.

Não aplicável

LISTA DE ABREVIATURAS

3D – *Three-dimensional* (Tridimensional)

2D – *Two-dimensional* (Bidimensional)

AAE – *American Association of Endodontist*

BMS – Membranas basais

CTM – Células-tronco mesenquimais

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM – *Dulbecc's Modified Eagle Medium* (Meio Modificado de Eagle de Dulbecco)

DMSO – *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DPEM – *Decellularized extract Matoug-Ewerfelli (2018)* (Extrato de polpa descclularizada Matoug-Ewerfelli (2018)).

DPES – *Decellularized extract Song (2017)* (Extrato de polpa descclularizada Song (2017)).

DPSCS – *Dental Pulp Stem Cells* (Células-Tronco da Polpa Dentária)

DPM – *Decellularized – Matoug-Ewerfelli (2018) protocol* (Polpa descclularizada – Protocolo de Matoug-Ewerfelli (2018))

DPS – *Decellularized – Song (2017) protocol* (Polpa descclularizada – Protocolo de Song (2018))

DP – *Decellularized* (Polpa descclularizada)

ECM – *Extracellular matrix* (Matriz extracelular)

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Ácido etilenodiaminotetracético) – *European Society of Endotology*

FBN – *Fibrillin* (Fibrilina)

FBS – *Fetal Bovine Serum* (Soro fetal bovino)

FDPM – *Freeze-dried decellularized pulp Matoug-Ewerfelli (2018)* (Polpa descclularizada liofilizada Matoug-Ewerfelli (2018))

FDPS – *Freeze-dried decellularized Song (2017)* (Polpa descclularizada liofilizada Song (2017))

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GAG – Glicosaminoglicahás

HA – Ácido hialurônico

h – hours

hPD – *Human dental pulp* (Polpa dentária humana)

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IC – Insuficiência cardíaca

MEC – Matriz extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MECd – Matriz extracelular descelularizada

MSC – Célula-tronco mesenquimal

MSC-Exo – Exossomos derivados de célula-tronco mesenquimal

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NaOH – Hidróxido de sódio

NGF – Crescimento nervoso

OSM – Osteocalcina M

PAA – Ácido paracético

PDGF – Crescimento derivado de plaquetas

PGA – Ácido poliglicólico

PLA – Ácido polilático

PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

POSTIN – Periostin (Periostina)

PRF – Plasma rico em fibrinas

PRP – Plasma rico em plaquetas

PTX3 – *Pentraxin* (Pentraxina)

PVA/CS – Arcabouço de nanofibra e quitosana

SD – Desoxilato de sódio

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

SHEDS – Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos

TBS – *Tris-Buffered Saline* (Solução salina tampão Tris)

TCLE – Termo de consentimento esclarecido

TGF – Fator de crescimento transformador

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

UCB – Universidade Católica de Brasília

UnB – Universidade de Brasília

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

PREFÁCIO	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 POLPA DENTAL	18
1.2 TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA	20
1.3 MATRIZES EXTRACELULARES	21
1.4 PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR	24
1.5 O USO DA MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA EM TERAPIAS REGENERATIVAS	28
1.6 USO DA MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA NA TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA	30
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	37
3.3 CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS PULPARES.....	38
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	38
3.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE DESCELULARIZAÇÃO	39
3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA RESIDUAL.....	40
3.7 PREPARO DOS EXTRATOS E LIOFILIZAÇÃO DO TECIDO PULPAR.....	40
3.8 PERFIL DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	40
3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR (MTT).....	41
3.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	41
3.11 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E POTENCIAL PROLIFERATIVO	42
3.12 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR – MÉTODO <i>SCRATCH</i>	42
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 CAPÍTULO 1: MANUSCRITO.....	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6 REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E MATERIAIS E MÉTODOS)	79

7	ANEXOS	93
----------	---------------------	-----------

PREFÁCIO

A jornada que culminou neste trabalho teve início ainda na graduação, quando fui apresentada ao universo da pesquisa por meio da iniciação científica. Como bolsista do Programa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBIT), tive a oportunidade de participar do projeto "Análises *in vitro* e *in vivo* de peptídeos de defesa do hospedeiro como terapia antimicrobiana e imunomodulatória na endodontia". Essa experiência foi determinante para despertar meu interesse pelo potencial da ciência na busca por soluções inovadoras no reparo dentário, unindo os princípios da endodontia e da bioengenharia.

Concluí minha graduação em Odontologia em 2017, motivada a aprofundar meus conhecimentos na endodontia. Em 2020, finalizei minha especialização na área, o que reforçou minha busca por alternativas terapêuticas que transcendam as abordagens convencionais. O desejo de explorar novas possibilidades no campo da pesquisa me levou a ingressar no mestrado em 2022, dando continuidade aos estudos iniciados pelo nosso grupo de pesquisa e ampliando a investigação sobre a descelularização do tecido pulpar e sua interação com células da polpa dentária. Neste período, o grupo já havia realizado uma primeira avaliação da polpa dentária descelularizada, cujos resultados foram publicados em 2023. Nesse estudo, observou-se que a descelularização preservava a arquitetura da matriz extracelular, além de preservar algumas proteínas chave essenciais para o processo de regeneração pulpar, evidências que poderiam favorecer a adesão e interação celular.

Desta forma, dando continuidade a esses achados, a proposta deste trabalho foi investigar a interação entre a polpa dentária descelularizada e células pulpares, tendo a polpa dentária descelularizada como um biomaterial, em duas diferentes formas de apresentação. O principal objetivo deste estudo foi avaliar como o tecido pulpar descelularizado poderia ser utilizado como um possível arcabouço biológico para a terapia endodôntica regenerativa. Para isso, realizamos a caracterização da matriz extracelular, seguida pela análise da interação de células pulpares frente a esse biomaterial, sendo analisado presença de morte celular, morfologia, capacidade proliferativa e migratória. Estas análises permitiram uma avaliação aprofundada da resposta celular e sua adaptação ao novo ambiente proporcionado pela matriz extracelular descelularizada.

A escrita desta dissertação seguiu o formato de capítulos, descrito nas normas para redação de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UnB. Desta forma, este trabalho apresenta os seguintes itens: introdução, objetivos e materiais e métodos, escritos em português. Este segmento inicial fornece o embasamento teórico do estudo, delinea os objetivos propostos e detalha os procedimentos metodológicos empregados. O primeiro capítulo corresponde ao artigo científico, escrito em inglês. Esse capítulo consiste no esboço do artigo científico destinado a submissão na revista *International Endodontic Journal*, contendo os resultados obtidos no estudo e sua discussão com base na literatura atual. Na sequência, considerações finais, redigido em português, apresenta uma análise integrada dos achados do estudo, destacando suas implicações científicas e clínicas. Além disso, são discutidas perspectivas futuras para a aplicação dos biomateriais desenvolvidos.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio inestimável de meus orientadores, colegas de laboratório e das instituições que tornaram essa jornada viável. A todos que, de alguma forma, contribuíram para este estudo, meu mais sincero agradecimento. Espero que os conhecimentos aqui apresentados possam não apenas enriquecer a literatura científica, mas também inspirar novas pesquisas que, no futuro, contribuam para avanços na prática clínica e para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Polpa dental

A polpa dental é um tecido conjuntivo altamente vascularizado localizado no interior dos canais radiculares, originário da lâmina dentária, derivada da proliferação das células da crista neural. As células indiferenciadas da polpa dentária, localizada na região, se diferenciam em fibroblastos e odontoblastos, tanto no processo de rizogênese no período de formação do elemento dentário, como ao longo da vida, com o objetivo de limitar ou reparar o dano causado durante um processo infeccioso, induzindo a formação de células especializadas da polpa (Khorasani et al., 2020; Vaseenon, 2022; Yu and Abbott, 2007).

A composição do tecido pulpar é baseada em moléculas de colágeno, proteoglicanos e fibronectina, que formam o arcabouço da matrix extracelular (MEC). Este tecido também contém diferentes tipos de glicoproteínas. Além disso, inclui células indiferenciadas, fibroblastos e odontoblastos. Há a presença de células vasculares, células de defesa, vasos sanguíneos e fluidos intersticiais. Por fim, o tecido é innervado por axônios provenientes de fibras nervosas que acompanham os vasos sanguíneos, formando o feixe neurovascular do núcleo pulpar (Das et al., 2014; Rechenberg, Galicia e Peters 2016; Zanini, Meyer e Simon 2017).

Para manter a proteção da polpa dentária contra microrganismos, esse tecido é envolto pela dentina, que, por sua vez, é recoberta pelo esmalte na região da coroa e pelo cimento na raiz, formando sua proteção mecânica ao ambiente bucal. O complexo dentino-pulpar apresenta uma capacidade de resposta frente a estímulos agressores, tendo como objetivo principal diminuir ou limitar os danos causados. Os estímulos agressores, causados por lesão cáries e fraturas coronárias ou radiculares, são as duas principais condições que podem afetar a integridade da câmara pulpar, criando vias para a entrada de microrganismos e seus metabólitos na polpa, promovendo inflamações agudas no tecido pulpar que ao se disseminarem, podem resultar em infecções crônicas afetando os tecidos circunvizinhos e o osso alveolar (Das et al., 2014; Goldberg, Njeh e Uzunoglu, 2015; Galicia and Peters, 2016; Muñoz-Carrillo et al., 2021; Rechenberg; Vaseenon, 2022).

Outras vias potenciais para infecção microbiana pulpar incluem, fissuras dentinárias, tubulação dentinária exposta ou forame apical principal. Em todos os casos, se houver o rompimento da barreira de defesa, o sistema imune derivado das células de defesa, desencadeiam respostas para os microrganismos e seus subprodutos. Nesse sentido, células de

defesa, como os macrófagos e células dendríticas, atuam no reconhecimento dos patógenos enquanto os odontoblastos, atuam como barreira de defesa mecânica frente a invasão dos microrganismos (Farges *et al.*, 2015; Kanno *et al.*, 2020; Mehboob *et al.*, 2021).

As fibras nervosas por sua vez, detectam sinais sensoriais, causados principalmente pela liberação de mediadores inflamatórios. Diversas moléculas secretadas pelos neurônios, como neurotransmissores, neuropeptídeos e aminoácidos, induzem a sensibilização e promovem a sintomatologia dolorosa, além de mediar fibroblastos, odontoblastos, células imunes e células endoteliais vasculares (Kokkas *et al.*, 2011; Rechenberg, Galicia e Peters 2016).

Clinicamente, quando o processo infeccioso se estabelece o tratamento endodôntico se faz necessário. No entanto, o tratamento endodôntico convencional não está indicado nos casos de dentes permanentes imaturos com rizogênese incompleta, devido a interrupção do desenvolvimento radicular, seja por processo infeccioso ou traumático. Entre os traumas que podem comprometer o desenvolvimento radicular, destacam-se as fraturas de tecidos mineralizados, como fraturas coronárias e radiculares, além de luxações dentárias (subluxação, luxação lateral, extrusiva ou intrusiva) e avulsão, pois ao comprometerem o suprimento sanguíneo ao ápice, podem interromper o processo de formação radicular (Kokkas *et al.*, 2011; Rechenberg, Galicia and Peters, 2016; Vaseenon, 2022). Nestas situações clínicas, modalidades diferentes de tratamentos e protocolos têm sido desenvolvidas para promover a formação de tecido perdido e induzir a continuidade da formação da raiz. Dentre estes, estão os protocolos de revascularização pulpar. Para este protocolo é necessária a interação induzida com células tronco da papila apical, com o objetivo de formar novo tecido vivo vascularizado e promover a continuidade da formação da raiz.

Outro protocolo de tratamento é o processo de apicificação. Este processo objetiva induzir a formação de uma barreira de tecido mineralizado na região apical da raiz incompletamente formada, por meio da aplicação de um biomaterial. Tradicionalmente, a apicificação era realizada com múltiplas trocas de hidróxido de cálcio ao longo de vários meses, o que demandava um longo tempo de tratamento e apresentava risco de fraturas radiculares devido à fragilidade da estrutura dentária. Com os avanços na endodontia, técnicas mais modernas passaram a empregar materiais biocerâmicos, como o MTA (*Mineral Trioxide Aggregate*) ou o Biodentine, que permitem a criação de um *plug* apical em uma ou poucas sessões, reduzindo o tempo clínico e promovendo melhor vedamento apical (Çiçek *et al.*, 2017; Mohite *et al.*, 2022; Panjwani *et al.*, 2024)

Por fim, os protocolos de terapia endodôntica regenerativa, também se apresentam como protocolos promissores. Estes visam a utilização da tríade representada por células tronco,

fatores de crescimento e arcabouços biológicos ou sintéticos. No entanto, apesar do potencial dessas terapias, diversos desafios ainda precisam ser superados. Um dos principais desafios está relacionado à formação de tecidos que, frequentemente, se assemelham mais a um tecido cicatricial do que ao tecido pulpar funcional desejado. Além disso, ainda são necessários estudos mais aprofundados para o desenvolvimento de biomateriais que proporcionem um microambiente ideal à regeneração, garantindo não apenas a formação de novo tecido, mas também sua funcionalidade e integração ao tecido dentinário remanescente (Kokkas et al., 2011; Goldberg, Njeh e Uzunoglu, 2015; Matichescu et al., 2020).

1.2 Terapia endodôntica regenerativa

A terapia endodôntica regenerativa tem como objetivo a criação de novos tecidos capazes de substituir a estrutura do tecido pulpar infectado. O sucesso da técnica envolve a implantação de arcabouços, fatores de crescimento e células-tronco. Para esse fim, têm sido aplicadas técnicas avançadas, como a impressão celular tridimensional (3D), arcabouços injetáveis e terapia gênica. O objetivo é restaurar não apenas a integridade estrutural, mas também a função sensorial do tecido pulpar, promovendo a deposição de tecido mineralizado, vascularização adequada e indução de fibras nervosas (Zhan et al., 2021; Murray, 2023;).

As estratégias se baseiam em abordagens de *homing* celular, que promove o recrutamento de células-tronco endógenas para o interior do canal radicular; e em transplantes ou indução de células-tronco, combinadas com fatores de crescimento e arcabouço, a fim de construir ambiente adequado para a regeneração do tecido pulpar. No que se refere às células, o tecido pulpar mostra-se altamente rico na presença de células-tronco, as quais são essenciais para os diversos eventos moleculares e celulares envolvidos com a formação, manutenção e regeneração da polpa dentária. As células-tronco da polpa humana abragem as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) isoladas de tecidos da polpa dentária de dentes permanentes extraídos e células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) (Miura et al., 2003; Macrin et al., 2019; Mattei et al., 2021; Tong et al., 2022).

Estudos recentes demonstraram que as DPSCs, apresentam capacidade de diferenciação multipotente e podem promover diversos processos biológicos incluindo, odontogênese, osteogênese, angiogênese, miogênese e condrogênese. As células-tronco mesenquimais (MSCs) secretam uma variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento que promovem a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, induzindo a homeostasia tissular e imunológica sob

condições fisiológicas. Além disso, expressam marcadores celulares que as caracterizam como células de clonogenicidade e alta capacidade proliferativa como os marcadores: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, STRO-1 e aldeído desidrogenase 1 (Ravindran, Huang e George 2014).

Além da presença das células, os fatores de crescimento desempenham um papel crucial na regeneração dos tecidos. Essas biomoléculas ativas têm a capacidade de regular os processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e migração celular. No contexto da regeneração do tecido pulpar, algumas das principais proteínas envolvidas são o fator de crescimento do fibroblasto (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento nervoso (NGF) (Mitsiadis, Magloire e Pagella, 2017). Esses fatores de crescimento desenvolvem ambiente favorável para a regeneração tecidual, promovendo a formação de um novo tecido pulpar funcional (Brizuela *et al.*, 2022).

Nesse contexto, os arcabouços são estruturas tridimensionais que promovem suporte estrutural para as células indiferenciadas e também para os fatores de crescimento. Além disso, servem como veículos para o transporte celular controlado e apresentam diversas composições estruturais. Dentre essas composições estão os arcabouços de colágeno, gelatina, ácido polilático-co-Glicólico (PLGA), fibrina e MEC. As técnicas com arcabouço da MEC são técnicas de pesquisas mais recentes, e apresentam grande potencial, devido a capacidade de mimetizar o tecido natural, diminuindo a rejeição do organismo receptor (Granz e Gorji, 2020; Kasravi *et al.* 2023; Zhang *et al.*, 2017, 2022).

Nesse sentido, a tríade composta por células, fatores de crescimento e arcabouços representa uma alternativa promissora em procedimentos regenerativos. Além disso, proporciona um ambiente propício para o desenvolvimento e diferenciação celular, contribuindo significativamente para a regeneração do tecido pulpar danificado ou perdido (Brizuela *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

1.3 Matrizes extracelulares

As matrizes extracelulares são estruturas teciduais formadas, principalmente, por proteínas. Apresentam propriedades biomecânicas, físicas, tridimensionais que fornecem suporte aos tecidos e modulam o comportamento celular, incluindo adesão, diferenciação, proliferação, migração e expressão funcional. São estruturas bioativas com baixa imunogenicidade e alta atividade biológica para transplante (Theocharis *et al.*, 2016; McInnes,

Moser and Chen, 2022). Essas matrizes apresentam em sua composição proteínas estruturais, como colágeno e elastina; proteínas adesivas, como fibronectina e laminina e a presença de várias glicoproteínas e proteoglicanos (Carraher e Schwarzbauer, 2010; Theocharis et al., 2016; Karamanos et al., 2021; McInnes, Moser and Chen, 2022; Singh). Essas características possibilitam a junção das proteínas e dos peptídeos derivados da MEC em biomateriais, fornecendo uma ampla vantagem para imunomodulação por meio de interações materiais, tanto na liberação controlada de fármacos, como no processo regenerativo (Rowley *et al.*, 2019).

A medicina regenerativa tem investido no uso de arcabouços de matriz extracelular descelularizadas (MECd), de órgãos inteiros ou pequenos fragmentos, para promover o reparo e reconstrução de variados tipos de tecido (Liu et al. 2022). O reparo desses tecidos é esperado em casos de doenças graves como infecções, tumores, traumas, doenças degenerativas neurais e ósseas, insuficiência cardíaca, insuficiência hepática, necrose tecidual, entre outros, que causam grandes problemas clínicos e que comprometem a vitalidade dos órgãos com a necessidade de substituição. Para todos os casos, diversos tratamentos já são aplicados na tentativa de reverter os danos, como os casos com aplicabilidade para enxertos de materiais sintéticos ou até mesmo transplante de órgão inteiro. Embora seja uma alternativa viável, pode haver a rejeição pelo paciente receptor, mesmo que o doador seja compatível (Neve et al., 2014; Aamodt e Grainger, 2016).

Dessa forma, a engenharia de tecidos propõe estudos que buscam restaurar a vitalidade do órgão através da indução de um processo de remodelação e reparo, com a utilização de arcabouços, fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras, com a manipulação de genes para restaurar ou estabelecer a função normal através da cura endógena dos tecidos ou órgãos, utilizando técnicas *in vivo* e *ex vivo* e aplicações clínicas (Neve *et al.*, 2014). Os arcabouços descelularizados, podem fornecer a sinalização adequada para modular a função celular, e demonstraram superioridade em relação a capacidade de diferenciação de células-tronco, em comparação com cultura de tecidos artificiais e biomateriais naturais (Neve et al., 2014; Aamodt e Grainger, 2016).

O uso das MECs artificiais, por algum tempo foi uma alternativa viável devido a facilidade de aplicação, porém não apresentam a capacidade de alcançar as propriedades da MEC nativa, o que torna sua aplicação limitada, e por esse motivo justifica-se a busca por MECs híbridas, que possam apresentar as vantagens das MECs nativas e artificiais (Muncie e Weaver, 2018).

Diferentes métodos de fabricação dos biomateriais empregados para substituição de diferentes tecidos lesados são desenvolvidos por alguns autores a fim de proporcionar melhor

qualidade de vida para os pacientes. Uma variedade de tecidos e órgãos são usados como fontes de MECd e estes incluem fígado, coração, tecido adiposo, cartilagem e pele de diferentes fontes, incluindo humanos, porcos, ratos, dentre outros (Yao et al., 2019; Yang, Dang e Xu, 2022). As principais fontes de órgãos/tecidos derivados da MECd são os suínos. Estudos envolvendo o reparo nervoso com tecido suíno obtiveram resultados ideais, pois houve retenção de diferentes tipos de proteínas funcionais, incluindo colágenos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fatores de crescimento, que promoveram ambiente favorável para a proliferação das células de Schwann e o crescimento do axônio (Li, Javed e Ao, 2021).

Estudos envolvendo o uso de arcabouços acelulares injetáveis, para o tratamento do infarto agudo do miocárdio (IAM) e para a insuficiência cardíaca (IC) crônica, envolve hidrogel injetável de matriz miocárdica, derivado de MECd ventricular de suínos, que pode ser administrado com cateter transendocárdico (Wassenaar *et al.*, 2016). A injeção é capaz de modular as vias de inflamação, redução de morte celular e hipertrofia cardíaca, além de aumentar significativamente a neovasculatura do infarto (Singelyn et al., 2012; Seif-Naraghi et al., 2013; Wassenaar et al., 2016).

Diferenciações osteogênicas das MECd de osso bovino *in vitro* foram resultados de alguns estudos, e produziu um efeito sinérgico para melhorar a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em ratos, proporcionar melhor condução óssea e osteocondução (Lee *et al.*, 2016). Os arcabouços da cartilagem costal e osteocondral, também contribuíram para o estudo de doenças degenerativas, como a osteoartrite, com envolvimento de cartilagens (Li *et al.*, 2021). Desse modo, o arcabouço osteocondral acelular apresentou a capacidade de reparar defeitos osteocondrais com efeito reparador (Zhu et al., 2021).

Doenças, como anemia falciforme, câncer e infecção pelo HIV, estão entre as principais doenças que levam ao comprometimento do baço. Estudos recentes, investigam a reconstrução desse órgão com as próprias células do hospedeiro, e desenvolvem arcabouço que apresenta capacidade de fornecer base para a reconstrução desses tecidos e possivelmente sua substituição (Zanardo *et al.*, 2020).

Diante dos resultados promissores obtidos em diversos estudos, utilizando órgãos diferentes, a ideia da regeneração com arcabouços acelulares também tem sido estudada para a recuperação do tecido pulpar inflamado/infectado e para o reparo de defeitos periodontais (Adanir, Khurshid e Ratnayake, 2022; Liang, Liao e Tian, 2023). A polpa dentária invariavelmente responderá com inflamação em resposta a presença microbiana (por cárie ou doença periodontal, por exemplo) ou trauma (Zanini, Meyer e Simon, 2017; Caeiro-Villasenín et al., 2022). A gravidade e forma desta resposta pulpar irá determinar qual o tratamento será

mais adequado (Gibbison e Crozier, 2022; Karamifar, Tondari e Saghiri, 2020). Em casos mais graves, esse tecido pulpar irá sofrer degradação tecidual irreversível, e possivelmente irá resultar em necessidade de tratamento endodôntico, com remoção da polpa dentária infectada e limpeza dos canais radiculares (Adanir, Khurshid e Ratnayake, 2022).

A MECd do tecido pulpar pode ser obtida através da polpa removida dos dentes extraídos para fins ortodônticos ou pela extração de terceiros molares hígidos. A polpa dentária é um tecido altamente especializado com potencial de defesa, reparo e regeneração, pois sua composição contém células de função sensorial e células residentes, capazes de promover o reparo fisiológico e induzir a diferenciação celular (Khurshid et al. 2022). Fatores regenerativos presentes na MEC da polpa dentária, além da presença do colágeno, são fatores que induzem a angiogênese, e colaboram para a possível formação de um novo tecido. Sendo assim, estas características podem contribuir para que o arcabouço biológico seja compatível e contenha elementos estruturais naturais da MEC necessários para a regeneração tecidual (Alqahtani et al., 2018; Fu et al., 2020; Alghutaimel et al., 2021).

1.4 Processos de descelularização da matriz extracelular

Utilizar MEC descelularizada é uma nova abordagem para realizar a reconstrução de órgãos e tecidos. A arquitetura estrutural e os componentes bioquímicos retidos são variados de acordo com o detergente utilizado e o protocolo de descelularização (Tiemann *et al.*, 2020). Diversas técnicas de descelularização são aplicadas com o objetivo de promover a remoção de componentes nucleares e intracelulares de determinado órgão ou tecido, o que permite a diminuição da imunogenicidade, responsável pela rejeição do tecido doado. Fatores como a preservação da histoarquitetura tecidual, preservação dos fatores de crescimento e proteínas, favorecem o repovoamento celular e a regeneração dos tecidos (Wang et al., 2014; Gilpin and Yang, 2017).

Métodos químicos, físicos e enzimáticos, ou uma combinação entre eles são utilizados para remover conteúdo genético do tecido, pois os detritos celulares residuais podem ser tóxicos para as células que irão desencadear resposta inflamatória exacerbada e que podem ser destrutivas *in vivo* (Crapo, Gilbert e Badylak, 2011). Os critérios para avaliar a eficácia desses protocolos são realizados com testes de extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), onde a MECd deve conter menos de 50ng de DNA por mg de peso seco da MEC, e pela coloração de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que irá avaliar quantitativamente o conteúdo proteico e presença nuclear visível nas imagens obtidas (Gilpin and Yang, 2017; Kasravi et al. 2023).

Os agentes descelularizantes mais comuns são utilizados no método químico. Neste método, utilizam-se detergentes que são classificados em detergentes iônicos, responsáveis por solubilizar as membranas celulares e desnaturar as proteínas (Crapo, Gilbert e Badylak, 2011). O dodecil sulfato de sódio (SDS) é classificado como um surfactante iônico com aplicação bem-sucedida, pois apresenta eficiência em remover 90% do DNA em grande quantidade de tecidos inteiros densos ou parte deles, como valva cardíaca suína (Roderjan *et al.*, 2019), pulmão de rato (Calle *et al.*, 2016; Ohata e Ott, 2020) suínos e humano (Gilpin *et al.*, 2014), bexiga suína (Rosario *et al.*, 2008), córnea suína (Fu *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011), rim suíno (Wang *et al.*, 2015; Uzarski *et al.*, 2023), ovário suíno (Almeida *et al.*, 2023), articulação temporomandibular (ATM) suína (Lumpkins, Pierre and McFetridge, 2008) e polpa dentária (Song *et al.*, 2017; Bakhtiar *et al.*, 2020; Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2020).

Alguns estudos, no entanto, relatam que embora consiga promover a descelularização de forma satisfatória, esse detergente pode alterar a estrutura mecânica da MEC, sendo prejudicial para as proteínas estruturais e de sinalização, reduzindo a quantidade de fatores de crescimento e alterando seus principais componentes - colágeno, fibronectina e laminina - que pode afetar significativamente a aderência no repovoamento celular (Ahmed, Saleh e Xu, 2021). Outro agente não iônico é o desoxicolato de sódio (SD), porém apresenta características maiores de biocompatibilidade, por serem mais suaves que o SDS (Gilpin e Yang, 2017; White *et al.*, 2017).

Os detergentes não iônicos atuam na interrupção das interações lipídeo-lipídeo, lipídeo-proteína e DNA-proteína. O Triton X-100, é classificado como um detergente menos agressivo ao ser comparado com o SDS, isso devido a sua capacidade de remover o conteúdo genético sem prejudicar a integridade tecidual quando em concentrações mais baixas. Estudo envolvendo a descelularização de rins e fígados suínos inteiros, demonstrou a capacidade do Triton X-100 em remover os resíduos dos grupos tratados em combinação com SDS, e garantiu que as matrizes não fossem citotóxicas para as células. Em contrapartida, estudos indicam que o uso do Triton X-100 isolado, para remoção de tecidos mais densos, tem sua capacidade de descelularização diminuída (Gilpin and Yang, 2017; Liu *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2021).

Alguns protocolos químicos utilizam métodos com ácidos e bases representado pelos agentes: ácido peracético (PAA) e o hidróxido de sódio (NaOH). O primeiro apresenta propriedades altamente corrosivas e forte, seus efeitos como agente descelularizante são fracos embora apresente efeitos de esterilização do arcabouço descelularizado, pode acompanhar consequências indesejadas como danificação da estrutura tridimensional da MEC com efeitos prejudiciais sobre a função do arcabouço e as propriedades regenerativas. Em contrapartida, o

NaOH remove conteúdo genético de maneira eficaz, porém danifica significativamente a estrutura da MEC e diminui o conteúdo de fatores de crescimento (Wang et al., 2015; Gupta, Mishra e Dhasmana, 2018; Kasravi et al. 2023; Uzarski et al., 2023).

Os agentes enzimáticos são utilizados em combinação com agentes químicos para complementar sua eficiência, frequentemente utilizada para interromper as interações entre as células e a MEC, ou para remover material antigênico para diminuir a imunogenicidade dentre eles estão: tripsina, pepsina, Dnase e Rnase (Ramm *et al.*, 2020). O Triton X-100, apesar de apresentar boas características, decompõe fragmentos de DNA maiores que o SDS/SD, dessa forma o uso de Dnase quebra o DNA em fragmentos menores facilitando a remoção. A desvantagem desses materiais está na interrupção da estrutura do colágeno, lamina e elastina. Assim como os agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sozinhos apresentam baixa capacidade de remoção celular e de antígenos (Gilpin and Yang, 2017; Liu et al., 2018; Ramm et al., 2020).

Embora os métodos químicos sejam amplamente utilizados, há uma discussão quanto a possível toxicidade desses produtos que podem afetar a imunogenicidade dos tecidos e consequentemente aumentar o risco de rejeição tecidual. Nesse contexto, protocolos de descelularização física como congelamento, agitação mecânica e sonicação, têm sido frequentemente aplicados para facilitar a descelularização tecidual. A eficácia do protocolo, no entanto, só é possível quando há a combinação dos métodos citados, isso devido as características específicas de cada método que juntos podem contribuir para um tecido mais compatível (Tchoukalova *et al.*, 2018). A membrana celular deve ser primeiramente destruída via agitação mecânica imersa em detergentes iônicos ou não iônicos, ou seja, deve haver solubilização dos componentes celulares citoplasmáticos e nucleares usando SDS/SD associado ou não ao Triton X-100, seguido da digestão da matriz extracelular que pode ser mediada por tripsina/EDTA (Gilpin and Yang, 2017; Ramm et al., 2020).

Atualmente um método de descelularização assistida por apoptose é apontada como uma nova abordagem, e é baseada na morte celular programada, fragmentação e retenção de remanescentes celulares dentro da membrana celular. Um estudo projetou tecido nervoso em bioreator de perfusão e induziu a apoptose através da adição de um adjuvante ao meio de perfusão, ou seja, apoptado, com suplementação veicular como controle, não apoptado. O sistema de biorreator de perfusão promoveu a desvitalização da MEC com 95% das células mortas (Wachs *et al.*, 2022).

Os métodos químicos de descelularização também foram avaliados em MECs de tecidos pulpaes, para aplicação odontológica. Foram realizados modelos experimentais em tecido

pulpar de ratos, tecido pulpar bovino, suíno, canino e humano. Um estudo avaliou a matriz extracelular da polpa de cães beagles com o protocolo de descelularização conjunta de SDS e Triton X-100 com suplementação de lamininas, devido a expressão parcial de proteínas que é diminuída na MECd da polpa dentária. A laminina é um componente estrutural biologicamente ativo que pode promover a formação de tecidos dentinários e induzir a diferenciação dos odontoblastos, favorecendo a regeneração dos tecidos (Pigeot *et al.*, 2020).

Outro protocolo de descelularização pulpar, foi realizado em polpas dentárias de suínos. A combinação dos métodos de SDS em agitação mecânica, seguido de Triton X-100 e finalizado com método enzimático, removeu de forma efetiva os componentes celulares, preservando as proteínas da matriz extracelular e estruturas naturais. As matrizes foram transplantadas em camundongos combinado com as DPSCs humanos e promoveu o crescimento dos tecidos dentais (Hu *et al.* 2017). Todos os estudos realizados em tecidos pulpares de diferentes doadores utilizaram técnicas combinadas de SDS com Triton X-100, associados com produtos enzimáticos e quelantes, respectivamente: Dnase, Rnase, tripsina, collagenase e EDTA (Song *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Traphagen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018; Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018).

Ao final do tratamento com os reagentes específicos, essas matrizes devem passar por tratamento de esterilização ou desinfecção para continuidade dos testes. Esse processo garante que o material descelularizado não seja tóxico, e além disso, preserve as estruturas tridimensionais do arcabouço. O etanol e o isopropanolol são exemplos de desinfetantes comuns, que após a imersão tecidual promove a desinfecção alcólica, mas não a esterilização. Esse mecanismo pode alterar a estrutura tecidual e desnaturar as proteínas presentes no tecido se imerso por tempos prolongados, além disso, os alcóis não são capazes de matar esporos, o que torna sua ação questionável (Tao *et al.*, 2021; Afzal and Huguet, 2023).

O uso de antibióticos foi atribuído para a desinfecção em estudos com estômago, intestino delgado, pulmão, tendão, nervo, entre outros. A associação do antibiótico com outros métodos, devido ao especto antimicrobiano limitado, podem promover o estado asséptico dos tecidos. Essa associação pode ser realizada com o PAA, que é um desinfetante comum, e que em condições ideais pode ser usado como agente de esterilização química (Hodde *et al.*, 2007). Em altas concentrações esse reagente pode afetar as propriedades físicas e mecânicas das matrizes (Huang *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2021; Afzal and Huguet, 2023)

A manutenção das características mecânicas do tecido nativo é de grande importância para sua funcionalidade. Cada técnica de descelularização vai produzir efeitos diferentes nos tecidos. Deve-se garantir a manutenção das características elásticas, de viscosidade, resistência,

atração e escoamento, manutenção de proteínas específicas e fatores de crescimento. Abordagens combinadas veem apresentando resultados mais aceitáveis, embora ainda não exista a técnica ideal e que produza menos efeitos colaterais. A descelularização de cada tecido e órgão dependerá de fatores como a celularidade do tecido, densidade, conteúdo lipídico e espessura. A otimização do processo de descelularização e esterilização, podem minimizar a especificidade do doador-paciente e garantir a compatibilidade nos transplantes (Kasravi et al. 2023).

1.5 O uso da matriz extracelular descelularizada em terapias regenerativas

O uso dos arcabouços biológicos têm atraído interesse significativo no campo da engenharia de tecidos, devido à sua alta biocompatibilidade e bioatividade. Dentre diversos tipos de arcabouços existentes, destacam-se o uso da matriz extracelular descelularizada, que podem ser classificados de acordo com a sua origem, sendo eles: autógenos, alógenos e xenógenos. Sua fonte também pode determinar se a MECd é derivada de tecidos, como fígado, pâncreas, coração ou derivado de células progenitoras, como as células tronco mesenquimais (CTMs) (Brown et al., 2022; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Os arcabouços derivados de órgãos e tecidos inteiros preservam sua estrutura tridimensional, e apresentam benefícios para a regeneração de tecidos, podendo favorecer a migração, proliferação e diferenciação celular, além de manter suas características mecânicas de suportar a recelularização tecidual (Brown *et al.*, 2022). A desvantagem de seu uso está nas limitações quanto a necessidade de reimplante cirúrgico, promovendo maiores índices de rejeição. Por outro lado, quando a MECd é degradada e passa por processos de solubilização, algumas características são mantidas e a aplicação ocorre por injeção de hidrogéis injetáveis, ou aplicação de fragmentos bidimensionais (2D) e 3D, com a combinação ou não de nanopartículas que podem melhorar as características da matriz (Pati et al. 2014; Al-Hakim Khalak et al., 2022).

As CTMs que são cultivadas *in vitro* também podem contribuir para a regeneração tecidual, promovendo matriz de microvesículas extracelulares ao secretar exossomos, molécula com estrutura de membrana dupla em forma de taça e tamanho de 30 a 150 nm de diâmetro, que contêm fatores de crescimento, além de serem ricos em lipídios bioativos, proteínas, mRNAs e miRNA regulatórios, e que contribui na comunicação célula-célula e regula a função das células receptoras. Podem aumentar a capacidade de migração e proliferação e favorecer o rejuvenescimento celular. Além disso, apresentam vantagens de baixa imunogenicidade e

baixa capacidade de transferência de patógenos ao hospedeiro (Huang, Godkin e Schulze-Tanzil, 2017; Yang et al., 2018; Zhu et al. 2021).

Devido as limitações do uso imediato das matrizes após a descelularização, biomateriais baseados em MEC têm desempenhado um papel promissor na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa. Pó de matriz, biotintas e hidrógeis, são produtos que podem ser desenvolvidos a partir da MECd de um tecido degradado por solubilização, pulverização e liofilização. Esses processos facilitam a aplicação, por ser um método aplicado por injeção ou inserção local, e possibilitam a realização de implantação minimamente invasiva, visando a cicatrização de feridas, integridade tecidual e capacidade de recrutamento celular (Kim et al., 2017; Park, Gao and Cho, 2021; Zhe et al., 2023).

O pó da MECd pode ser usado na forma de partículas, ou dissolvido enzimaticamente e usado como fluido ou gel. Extratos de uma variedade de tecidos têm sido estudados para testar a capacidade de recrutamento celular, dentre eles o tecido adiposo, que tem sido uma fonte promissora de matriz, principalmente, pela alta quantidade de colágeno em sua composição. Numerosos vasos sanguíneos e tecido neoformado exibiu adipogênese com pequenas gotículas lipídicas intracelulares acumuladas, em estudo realizado com extrato de tecido adiposo alogênico, injetado em camundongos. Além disso, promoveu a eficácia na ação de fixação e proliferação celular para cultura de células 3D (Choi *et al.*, 2012; Saldin *et al.*, 2017).

Os hidrogéis, assim como o pó de MECd, também são preparados a partir do processo de moagem a base do colágeno, laminina, fibronectina, glicosaminoglicano (GAG) e fatores de crescimento, além de proteínas específicas da MECd. Estudos *in vitro* testaram diversas fontes teciduais em extratos de tecidos moles, que atestaram a efetividade das matrizes em comparação com o Matrigel, composto de cultura 3D comumente usado, um extrato de matriz que consiste principalmente de proteínas especializadas em MEC que compõem as membranas basais (Lin *et al.*, 2022; Peng *et al.*, 2023; Wei *et al.*, 2023).

Outro estudo avaliou o potencial de indução celular de três biomateriais à base de matriz extracelular comercialmente disponíveis: arcabouço de colágeno/glicosaminoglicano (Integra™ Matrix Wound Dressing), um peritônio suíno descelularizado (XenoMEM™) e uma bexiga urinária suína (MatriStem™). Os resultados afirmaram que os enxertos teciduais aumentaram a proliferação celular em modelo de cicatrização de feridas em camundongos, devido a presença de fatores de crescimento. Resultados como esses são encontrados em estudos com biomateriais produzidos pela MECd de órgãos como: bexiga, osso, intestino delgado, estômago, tecido adiposo, fígado, tecidos cardíacos, entre outros (Capella-Monsonís *et al.*, 2020; Sassi *et al.*, 2021).

A utilização de impressoras 3D também visa otimizar a resposta dos arcabouços na regeneração tecidual, possui capacidade de controlar o tamanho dos poros, porosidade e interconectividade da matriz. A MECd de osso liofilizado e solubilizado dentro de arcabouços impressos em 3D, possibilitou a introdução de uma rede matricial com porosidade em microescala que aumentou ainda mais a adesão celular *in vitro* e facilitou a penetração do vaso promovendo a formação de novo osso *in vivo* (Freeman *et al.*, 2019).

A bioimpressão atua na fabricação e construções de tecidos funcionais para substituir tecidos lesionados ou doentes. Essa abordagem permite a alta reprodutibilidade e controle preciso sobre as construções fabricadas de forma funcional, potencialmente permitindo a produção de alto rendimento. As biotintas são construídas através de um biomaterial específico ou por meio da mistura de biomateriais com a composição de hidrogel (Santis, De *et al.*, 2021). Estudo realizado por Pati e colaboradores, realizaram a descélularização do tecido adiposo, tecido cartilagenoso e tecido cardíaco, a fim de desenvolver biotintas fabricadas de MECd. A presença de proteínas nas matrizes mesmo após a descélularização é o que permite a vantagem nos preparos de modelos impressos desses tecidos, favorecendo a porosidade interconectada projetada, a introdução de células encapsuladas com controle de distribuição e a oportunidade de explorar aspectos organizacionais na regeneração de tecidos (Pati *et al.*, 2014; Gungor-Ozkerim *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

1.6 Uso da matriz extracelular descélularizada na terapia endodôntica regenerativa

O principal objetivo do tratamento endodôntico convencional é eliminar a inflamação e/ou a infecção pulpar, que ocorre principalmente por lesões de cárie ou trauma. Em casos de dentes permanentes jovens esse tratamento se torna mais difícil, pois esses elementos apresentam formação radicular incompleta, com ápices abertos e paredes radiculares frágeis. Tratamentos de apicificação e revascularização são opções de tratamento que se baseiam no uso de materiais bioativos provenientes do paciente, como a indução do sangramento apical, induzindo a formação tecidual de reparo (Wigler *et al.*, 2013; Ashiry, El *et al.*, 2016; Nicoloso *et al.*, 2017, 2019).

A engenharia de tecidos tem apresentado novas abordagens terapêuticas para resolver este problema, permitindo a regeneração de um tecido pulpar funcional. Entre diversos protocolos complexos, o uso de arcabouços da MECd tem sido promissor no estudo das terapias endodônticas regenerativas, pois visa a formação de novos tecidos e o restabelecimento da vitalidade de dentes imaturos, com o objetivo de continuar o desenvolvimento radicular.

Embora várias modalidades de tratamento tenham sido propostas para promover a regeneração pulpar, esses tratamentos apresentam alguns desafios a serem enfrentados (Lee et al., 2020; Karamanos et al., 2021).

Entre os desafios para o desenvolvimento das terapias, está em projetar um biomaterial adequado para ser utilizado como arcabouço. Por esse motivo diversos biomateriais têm sido desenvolvidos com o intuito de alcançar as características ideais para a regeneração tecidual pulpar e promover a diferenciação das células progenitoras, entre eles o uso de arcabouços poliméricos de hidrogel, polissacarídeos, alginato, quitosana, celulose, componentes da matriz extracelular, matriz extracelular descelularizada, ácido hialurônico, colágeno, gelatina, proteínas e peptídeos, fibrina, ácido polilático (PLA), Ácido poliglicólico (PGA), PLGA, arcabouços biocerâmicos, exossomos derivados de células-tronco mesenquimais (MSC-Exo) (Brown et al., 2022; Gonçalves da Costa Sousa et al., 2022; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Arcabouços de nanofibras de quitosana (PVA/CS) foram estudados recentemente pelo nosso grupo. Os resultados obtidos reforçam a eficiência das nanofibras com adição de ciprofloxacina (0,5%) e IDR-1002 (0,5%) em sua composição, apresentando atividade antibiofilme oral multiespécie e consequentemente alta atividade antiinflamatória em estudos *in vitro*. A resposta *in vivo* demonstrou capacidade de regeneração do tecido ao formar tecido semelhante a polpa em comparação com o controle. Esses resultados implicam em um avanço para a endodontia regenerativa e o uso de nanofibras PVA/CS como um protótipo promissor (Gonçalves da Costa Sousa *et al.*, 2022).

Considerando as propriedades químicas e mecânicas da MEC, os estudos consideram uma solução viável de arcabouço natural para a terapia endodôntica regenerativa, pois fornece composição estrutural ao tecido e direciona as respostas celulares. Os arcabouços de ácido hialurônico (HA), que é um GAG composto por subunidades repetidas e alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetil- D-glucosamina, presente na MEC do tecido conjuntivo, são apontados como promissores, embora apresentem técnicas limitadas para aplicação na terapia endodôntica regenerativa (Ahmadian et al., 2019; AlHowaish, AlSudani and AlMuraikhi, 2022).

Estudo *in vivo* realizado após a remoção da polpa dentária de ratos visando a regeneração pulpar, comparou a efetividade do arcabouço de HA e arcabouço de colágeno inseridos no espaço pulpar dos dentes de rato despolpados. O resultado demonstrou maior organização celular no tecido formado após a inserção do arcabouço de HA, além de menor quantidade de leucócitos granulados, sugerindo maior biocompatibilidade e biodegradação do HA para a aplicação como arcabouço (Inuyama *et al.*, 2010). Outro estudo utilizando o

Reháylane Lyft (HA), preenchedores dérmicos de ácido hialurônico, como arcabouço foi realizado em dentes de cães com formação incompleta da raiz. Os resultados alcançados favoreceram a vascularização e a formação de fibras do tecido regenerado, reforçando seu potencial para uso em terapia endodôntica regenerativa (AlHowaish *et al.*, 2022).

Os arcabouços de gelatinas, biopolímero natural derivado da hidrólise ácida parcial ou alcalina de colágeno animal de peles, ossos e tendões, são fabricados por técnicas de eletrofiação, separação de fases, lixiviação de porogênio e automontagem, são biodegradáveis e biocompatíveis além de apresentarem baixa antigenicidade. Estudos com liberação controlada do fator de FGF2 incorporados em hidrogéis de gelatina, demonstraram capacidade de estabelecer paredes de dentina acima do defeito dentinário exposto nos modelos *in vivo* (Kikuchi *et al.*, 2007; Ishimatsu *et al.*, 2009).

Outro importante biomaterial utilizado como arcabouço e considerado um dos principais componentes presente na MEC é o colágeno, principalmente o colágeno tipo I, pois apresentam alta biocompatibilidade e atividade biológica, podendo promover adesão, migração e proliferação celular (Ravindran, Huang e George, 2014). Os arcabouços geralmente apresentam estrutura porosa e garantem a interação das células, além de promover a diferenciação das DPSCs em linhagem osteoblástica, em estudo realizado em dentes de ovelhas. As propriedades do colágeno utilizadas em arcabouços híbridos podem favorecer a regeneração da polpa dentária (Kwon *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Dayı *et al.*, 2021).

Concentrados de plaquetas autólogos, como plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF), têm demonstrado resultados satisfatórios quando utilizados nos estudos de tratamento endodôntico regenerativo. O PRF promove a formação de uma rede de fibrina e libera fatores de crescimento que promovem a proliferação celular e a remodelação da matriz extracelular. O PRP libera fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento transformador, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento epitelial e fator de crescimento semelhante à insulina (Bezgin *et al.*, 2015; Alagı *et al.*, 2017; Bakhtiar *et al.*, 2017).

Um estudo comparou a taxa média de sucesso entre diversos estudos para fechamento ou redução apical após acompanhamento de 1 ano de tratamentos endodônticos regenerativos, utilizando coágulo sanguíneo, PRF e PRP. Os resultados apontaram maior taxa de sucesso com os arcabouços de PRP e PRF, sendo em média 64% a 74%, respectivamente, o sucesso obtido para os casos que houve a continuidade do crescimento radicular. Quanto a cicatrização da lesão periapical os resultados alcançaram um sucesso de 100% em comparação com os casos de coágulo sanguíneo, além de alcançarem o fechamento apical completo (Murray, 2018).

Estudos recentes têm demonstrado o potencial clínico do uso de concentrados autólogos de plaquetas em protocolos de terapia endodôntica regenerativa (TER). Quando utilizados como arcabouços biológicos, materiais como a fibrina rica em plaquetas (PRF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas concentrado (CGF) revelaram resultados promissores no estímulo ao desenvolvimento radicular, na redução do tamanho do forame apical e na cicatrização de lesões periapicais (Kavitha *et al.*, 2022).

Segundo Li *et al.* (2023), tanto o PRF quanto o CGF apresentaram desempenho clínico semelhante quando avaliados quanto à cicatrização de lesões periapicais, eliminação de sinais e sintomas clínicos, e continuidade do desenvolvimento radicular. Esses achados reforçam o papel desses biomateriais como alternativas viáveis ao coágulo de sangue induzido, especialmente em situações em que a indução de sangramento não é possível ou apresenta limitações. Além disso, a biocompatibilidade, a liberação sustentada de fatores de crescimento e a facilidade de obtenção dos concentrados autólogos os tornam uma opção atrativa dentro do contexto da odontologia regenerativa, contribuindo para protocolos menos invasivos e com maior previsibilidade clínica.

A polpa extraída de dentes saudáveis, como aqueles indicados para extração em tratamentos ortodônticos ou terceiros molares hígidos, pode ser uma fonte valiosa de MEC no processo regenerativo devido às suas propriedades biológicas únicas. Esse tecido passa por processos de descelularização, que podem ser realizados por métodos mecânicos, químicos ou pela combinação de ambos, visando a remoção completa das células enquanto preserva a arquitetura da MEC. Estudos recentes têm explorado a descelularização de polpas dentárias de diferentes fontes, como suína, bovina, humana e de ratos, com o objetivo de desenvolver arcabouços biomiméticos altamente eficazes. A utilização de tecidos suínos e bovinos, por exemplo, tem ganhado destaque devido à sua abundância e facilidade de obtenção, enquanto as polpas humanas e de ratos são amplamente estudadas por sua relevância biológica e pela similaridade em termos de microambiente (Sonoyama *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2019; Bakhtiar *et al.*, 2020).

Esses avanços na descelularização têm possibilitado a criação de arcabouços capazes de suportar de maneira eficaz a migração e proliferação celular, fatores essenciais para a regeneração tecidual. Observações *in vivo* indicaram que o colágeno presente na MEC favorece a formação de novos vasos sanguíneos, promovendo angiogênese por meio da expressão de biomarcadores como osteocalcina M (OSM) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esses resultados reforçam o potencial das matrizes descelularizadas em suportar e guiar a regeneração pulpar (Cheng, Solorio e Alsberg, 2014).

A presença de glicosaminoglicanos, hialuronano, proteoglicanos, colágeno presentes na MEC do tecido pulpar descelularizado, são importantes na histoarquitura para apoiar as células tronco e induzir a diferenciação odontogênica (Ravindran, Huang e George, 2014). Nesse sentido, estudos *in vitro* e *in vivo* com tecidos da polpa de animais e humanos têm avaliado a capacidade dos arcabouços mediado por células tronco em promover a diferenciação celular e a formação de novos tecidos, incluindo tecido neural (Hu et al., 2017; Matoug-Elwerfelli et al., 2018; Matoug-Elwerfelli et al., 2020). Além disso, devido a capacidade da polpa em promover a calcificação distrófica na matriz pulpar conhecida como cálculo pulpar, um estudo realizou a avaliação do potencial do tecido pulpar descelularizado em promover a mineralização em defeitos ósseos (Lee et al., 2020).

As observações mencionadas em estudos anteriores estão em consonância com os resultados prévios de nossos estudos *in vitro*. Neste estudo foi realizado uma análise comparativa de dois protocolos de descelularização já descritos e previamente publicados pelos pesquisadores Song et al. (2017) e Matoug-Elwerfelli et al. (2018). Além da avaliação estrutural das matrizes, foi investigada a preservação de importantes proteínas após o processo de descelularização (Ribeiro et al., 2024). A análise qualitativa do proteoma revelou que o grupo submetido ao método de descelularização de Matoug-Elwerfelli et al. (2018) preservou 69,56% das proteínas em comparação com o grupo controle, enquanto o protocolo de Song et al. (2017) preservou apenas 28,26%. Dentre as proteínas identificadas em ambos os grupos descelularizados, destacam-se a proteína fibrilina (FBN1), com potencial para regular a biodisponibilidade do TGF- β 1, a proteína Periostin (POSTN), relacionada à adesão celular, e o colágeno VI (alfa1, alfa2 e alfa3). Proteínas como a tenascina e β -Tubulina III, relacionadas à odontogênese e à regulação neuronal, também foram identificadas em ambos os grupos. Além disso, a Pentraxin (PTX3), proteína relacionada à imunidade inata, apresentou um leve aumento após ambos os protocolos de descelularização, o que suscita dúvidas quanto à imunogenicidade tecidual dessas matrizes (Ribeiro et al., 2024).

Esses achados reforçam a hipótese de que o protocolo mais próximo ao tecido original é aquele que preserva uma maior quantidade de proteínas. Entretanto, ressalta-se a necessidade de novos estudos que investiguem a interação das matrizes com as células, visando avaliar seu potencial regenerativo. Outro ponto a destacar, é que apesar de apresentar bons resultados em estudos prévios, os arcabouços ainda possuem dificuldade de manuseio e aplicação clínica. Isso se deve principalmente ao fato do tecido pulpar estar envolto pela dentina, tendo apenas o forame apical como abertura para promover angiogênese e irrigação sanguínea para o tecido projetado. Além disso, a localização anatômica do tecido pulpar e sua microestrutura única

também contribuem para os desafios associados ao uso de arcabouços na regeneração do tecido pulpar (Khurshid et al., 2022). Diante desse contexto, é crucial realizar estudos aprofundados sobre a interação de células pulpares com polpas descelularizadas, avaliando sua compatibilidade e potencial de rejeição. Nesse sentido, este estudo investigou a capacidade de interação das células com a MECd do tecido pulpar, utilizando dois métodos de descelularização em diferentes apresentações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial do tecido pulpar descelularizado como arcabouço biológico para terapias endodônticas regenerativas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os produtos obtidos através da descelularização por meio de Espectrometria de Massa por Análise de Tempo de Voo e Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-ToF/MS) dos tecidos pulpare descelularizados pelos protocolos descritos previamente por Song *et al.* (2017) e Matoug Ewerfelli *et al.* (2018), em diferentes formas de apresentação.
- Avaliar a viabilidade de células pulpare em contato com os tecidos pulpare descelularizados pelos protocolos descritos previamente por Song *et al.* (2017) e Matoug Ewerfelli *et al.* (2018), em diferentes formas de apresentação.
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a adesão e interação das células pulpare humanas com os tecidos pulpare pelos protocolos descritos previamente por Song *et al.* (2017) e Matoug Ewerfelli *et al.* (2018), em diferentes formas de apresentação.
- Avaliar a capacidade de migração e proliferação das células pulpare em contato com os tecidos pulpare descelularizados pelos protocolos descritos previamente por Song *et al.* (2017) e Matoug Ewerfelli *et al.* (2018), em diferentes formas de apresentação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da matriz extracelular descelularizada proveniente da polpa dentária para aplicações em terapia endodôntica regenerativa. O estudo envolveu a realização de protocolos de descelularização, seguidos da avaliação da citotoxicidade, capacidade migratória e proliferativa dos tecidos pulpare descelularizados, visando explorar suas propriedades e eficácia no contexto regenerativo.

Grupos experimentais	
<i>DPS</i> <i>Decellularized pulp - Song protocol</i> Polpa descelularizada protocolo Song	Protocolo Song <i>et al.</i> (2017)
<i>DPES</i> <i>Decellularized pulp extract Song</i> Extrato da polpa descelularizada Song	
<i>FDPS</i> <i>Freeze-drying decellularized pulp Song</i> Polpa descelularizada liofilizada Song	
<i>DPM</i> <i>Dellularized pulp – Matoug-Elwerfelli protocol</i> Polpa descelularizada protocolo Matoug-Elwerfelli	Protocolo Matoug-Elwerfelli <i>et al.</i> (2018)
<i>DPEM</i> <i>Decellularized pulp extract Matoug-Elwerfelli</i> Extrato da polpa descelularizada Matoug-Elwerfelli	
<i>FDPM</i> <i>Freeze-drying decellularized pulp Matoug-Elwerfelli</i> Polpa descelularizada liofilizada Matoug-Elwerfelli	

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais utilizados para avaliar o efeito da descelularização da polpa dentária. Os grupos foram definidos com base no tipo de tratamento (descelularização com diferentes métodos separados em extratos e liofilização da polpa dentária) e as variáveis analisadas, como a viabilidade celular, migração e proliferação.

3.2 Caracterização da amostra

As amostras celulares e das matrizes descelularizadas foram obtidas de dentes hígidos

de pacientes tenham sido encaminhados para extração de terceiros molares na clínica integrada do curso de graduação da Universidade Católica de Brasília (UCB) e cursos de pós-graduação especializados em cirurgias odontológicas. Um total de 80 pacientes, de ambos os gêneros e idade entre 18 e 30 anos, foram convidados a participar da pesquisa, colaborando com a doação do terceiro molar hígido indicado previamente para extração apresentando ápice aberto ou fechado, inclusos ou semi-inclusos. Foram excluídos da pesquisa pacientes com idade inferior a 18 anos, que apresentaram terceiros molares afetados por lesões cariosas ou doença periodontal severa, ou que se negaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Cada paciente preencheu anamnese e foi registrado em seu prontuário todos os alertas sistêmicos. Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UCB (CEP/UCB: 5.806.133) (Anexo 1) e todos os preceitos éticos foram obedecidos.

3.3 Cultivo primário de células pulpare

As polpas dentárias foram obtidas a partir de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos entre 18 e 30 anos. O tecido pulpar foi extraído a partir da remoção total da coroa dos dentes, dentro de uma câmara de fluxo laminar, utilizando um alicate de corte seguido pela remoção do tecido pulpar por meio de curetas periodontais (Hu-friedy, Chicago, EUA) e limas endodônticas #25 e #40 tipo Kerr e Hedstroem (Dentsply, York, Pensilvânia, EUA). O tecido pulpar foi fragmentado e imerso em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). A cultura por explante foi realizada em placas de 6 poços, incubadas a 37 °C com 5% de CO₂, com troca de meio a cada 2-3 dias (Jiang *et al.*, 2008). Essas células foram subcultivadas conforme atingiam a confluência para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento.

3.4 Preparo das amostras

Os tecidos pulpares obtidos também foram submetidos aos protocolos de descelularização descritos por Song *et al.* (2017) e Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018). O primeiro protocolo escolhido foi o protocolo que obteve melhor resultado de descelularização no trabalho de Song *et al.* (2017). Neste protocolo, o tecido pulpar foi colocado sob imersão em solução tamponada (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 1mM, pH 8,2), durante 48h a 4 °C, com agitação constante em ThermoMixer, a partir daí a 24 °C em todos os demais passos, posteriormente,

incubado em SDS (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Cotia-SP, Brasil) a 1% durante 24h, seguidos de três ciclos de 30 minutos de lavagem em solução salina tamponada com Tris 25 mM (TBS) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (pH 7,6), seguido por um ciclo em 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (p/v) durante 24h e três ciclos de enxagues subsequentes durante 30 minutos cada, em TBS 25 mM (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (pH 7,6), seguidos de imersão em PBS mantidos a 4 °C (Song, Takimoto *et al.* 2017). O segundo protocolo selecionado foi descrito por Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018). Neste protocolo, os tecidos pulparem foram incubados em tampão Tris (10 mM tris) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), pH 8,0 contendo inibidor de protease [0,1% de ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA)] (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), durante a noite, a 4 °C. As amostras foram então colocadas em SDS a 0,03% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), durante 24h, à temperatura ambiente com agitação constante. Os tecidos foram lavados três vezes durante 30 minutos cada, TBS 25 mM (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (pH 7,6), seguidos de imersão em PBS mantidos a 4 °C (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018).

O segundo protocolo selecionado foi descrito por Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018). Neste protocolo, os tecidos pulparem foram incubados em tampão TBS (10 mM tris) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), pH 8,0, contendo inibidor de protease [0,1% de EDTA)] (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), durante a noite, a 4 °C. As amostras foram então colocadas em SDS a 0,03% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), durante 24h, à temperatura ambiente com agitação constante. Os tecidos foram lavados três vezes durante 30 minutos cada, em solução salina tamponada com Tris 25 mM (TBS) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (pH 7,6), seguidos de imersão em PBS mantidos a 4°C. (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018). Os tecidos foram esterilizados por imersão em solução de PBS contendo estreptomicina a 100 U.mL⁻¹ e 100 mg.mL⁻¹ por um período de 48 horas (Chen *et al.*, 2015).

3.5 Avaliação do grau de descclularização

A quantidade de fita dupla de DNA (dsDNA) nas matrizes descclularizadas é considerado o padrão-ouro para avaliar o grau de sucesso da descclularização. Dois critérios são determinantes para a matriz ser considerada descclularizada com sucesso: (1) deve conter < 50 ng.mg⁻¹ de tecido seco de dsDNA e (2) as matrizes coradas com DAPI ou hematoxilina e eosina não devem ter material nuclear visível (Crapo, Gilbert e Badylak, 2011). Inicialmente foi realizado um teste-piloto, com uma amostra para cada grupo: controle; descclularizado pelo primeiro protocolo (Song *et al.*, 2017); descclularizado pelo segundo protocolo (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018). Após a remoção celular as matrizes foram armazenadas em formaldeído

10% por 24h, e em seguida foram transportadas e processadas para parafinização e obtenção dos cortes histológicos.

3.6 Extração e quantificação do DNA residual

A extração de DNA foi realizada utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), obedecendo o protocolo do fabricante para purificação de DNA a partir de tecidos, e posteriormente, a quantificação de DNA foi realizada por método fluorimétrico (QUBIT) (Das *et al.*, 2014).

3.7 Preparo dos extratos e liofilização do tecido pulpar

Segmentos de polpas dentárias descelularizadas (DPs) foram finamente picados, pesados e separados em dois tubos eppendorff. As DPs do primeiro tubo foram deixadas para incubar em DMEM (1 mg/mL) por 72h a 37 °C com agitação. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 2000 g por 15 min e o sobrenadante foi coletado, filtrado e armazenados a 4 °C (Matoug-Elwerfeli *et al.*, 2020). O segundo tubo foi armazenado em -80 °C, para solidificar a presença de água nos tecidos. Após 24h, o tubo foi colocado em uma câmara de solidificação sob vácuo para liofilização e em seguida foi homogenizado em meio DMEM (Matoug-Elwerfeli *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2017).

3.8 Perfil de Espectrometria de Massas

Os extratos e o produto liofilizado foram analisados por Espectrometria de Massa por Análise de Tempo de Voo e Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-ToF/MS) (Autoflex Speed, Bruker Daltonics) com o objetivo de obter um perfil e analisar as diferenças entre os produtos obtidos. As amostras foram misturadas com uma solução de α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg.mL⁻¹) na proporção de 1:1 ou 1:3, aplicadas em uma placa-alvo MTP AnchorChip 400/384 e deixadas secar à temperatura ambiente. Os espectros foram adquiridos no modo linear na faixa de 800 – 20000 m/z, com calibração externa utilizando o padrão de calibração I (Bruker Daltonics), e no modo refletido positivo (700–3500 m/z), com calibração externa utilizando o padrão de calibração de peptídeos II (Bruker Daltonics). A análise dos espectros foi realizada por meio do software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Germany) (Koehbach *et al.*, 2016).

3.9 Avaliação da citotoxicidade celular (MTT)

A toxicidade dos extratos das DP e polpas liofilizadas foi avaliada na cultura de DPSCs. O método utilizado foi o MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), que avalia a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial. O MTT consiste em um método colorimétrico, baseado na capacidade das células vivas reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan. Inicialmente, DPSCs (1×10^4 células.mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h em uma incubadora de CO₂ a 37 °C. Após esse período, 200 µL de sobrenadante celular foram trocados pelos extratos e pela polpa liofilizada diluída, as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h e 72h. Após estes períodos de incubação, parte do sobrenadante foi removida, permanecendo apenas 45 µL deste em cada poço. Foram acrescentados 10 µL de MTT (0,05 mg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich), por poço, da placa de 96 poços (Kasvi), e as placas acondicionadas em estufa com 5% de CO₂, 37 °C e 95% de umidade, durante 4 horas. Finalizado esse período, a reação foi bloqueada com 60 µL por poço de dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Barker, Europa) e os poços foram homogeneizados para completa solubilização do conteúdo celular. Em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplacas (Bio-Tek Power Wave HT, EUA), com absorbância a 570 nm. Os resultados dos grupos experimentais foram subtraídos da amostra “branco” (meio de cultura, exclusivamente) e o percentual de viabilidade celular foi estabelecido após comparação com o grupo controle positivo (DPSCs), considerado como 100% de viabilidade celular (Mosmann, 1983).

3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia celular e topografia tecidual das DP foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JSM-7000F Scanning Microscope, JEOL, EUA). Para isso, lamínulas de vidro redondas com 13 mm x 13 mm (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) foram posicionadas na base da placa de 6 poços (Prolab, São Paulo, SP, Brasil), antes do cultivo das células. Em seguida, foram adicionados 2 mL de DP e DPES, 2mL de FDPM e FDPS, e as matrizes DP e DPM com 2 mL de meio de cultura DMEM sem soro, seguido pelas células (2×10^5). Após 72h, a lamínula foi fixada em glutaraldeído 2,5% por 24h, seguindo por duas lavagens com cacodilato de sódio. Posteriormente, as células foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 30 min em capela e realizado desidratação em solução de acetona 30, 50, 70, 95 e 100%. Após secagem da lamínula, esta foi metalizada e analisada em microscópio eletrônico de varredura (JMST33A Scanning Microscope, 56 JEOL, EUA). As imagens foram captadas em aumentos de 1000x, 3000x e 5000x para avaliação da interação celular (Song *et al.*, 2017).

3.11 Avaliação da viabilidade celular e potencial proliferativo

A avaliação do potencial proliferativo das células em contato com DPES, DPEM, FDPS e FDPM foi realizada utilizando a técnica de exclusão do Azul de Tripiano (Crowley *et al.*, 2016). O ensaio foi conduzido após os tempos experimentais de 0h, 24h e 48h. Em placas de 96 poços, foram adicionadas 1×10^4 células pulpares em 200 μL de DMEM (Sigma Chemical) sem SFB no grupo controle e nos demais grupos testados. Após os tempos experimentais serem completados, as células foram ressuspensas, e uma solução de Azul de Tripiano a 0,4% (Sigma Chemicals) foi adicionada por 1 minuto. As células foram contadas imediatamente utilizando uma câmara de Neubauer (Brand GmbH, Wertheim, Alemanha). Todas as contagens foram realizadas com três réplicas técnicas e biológicas de cada amostra em cada tempo experimental e comparadas com a contagem inicial de células do experimento (Crowley *et al.*, 2016).

3.12 Avaliação da Migração Celular – Método *Scratch*

Avaliação da migração celular foi realizada através do método de *Scratch* (Ieso, De e Pei, 2018). Nesse ensaio, células ($2,5 \times 10^5$ células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (Prolab) em meio DMEM (GIBCO), suplementado com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina (Invitrogen), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 10% de SFB (Cultilab), sendo mantidas até a formação de uma monocamada confluenta. Após a formação da monocamada, algumas células foram removidas da cultura com o auxílio de uma ponta de micropipeta de plástico com um orifício grande, simulando uma ferida. As células remanescentes foram lavadas três vezes com o meio descrito anteriormente. Neste momento, foram adicionadas as amostras a serem testadas DPES, DPEM, FDPS e FDPM. As culturas foram incubadas e monitoradas por até 48 horas. Fotografias foram tiradas com auxílio de microscopia nos tempos de 0, 24 e 48 horas para posterior análise. As imagens foram processadas, e as células localizadas na área da ferida foram contadas com o auxílio do *software Image J* (Ieso, De e Pei, 2018).

3.13 Análise Estatística

Os experimentos foram conduzidos em três réplicas técnicas e repetidos em três momentos distintos. A normalidade de todas as variáveis mensuradas foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (DP). Para a análise estatística, foram realizadas ANOVA unidirecional e bidirecional, para avaliar os

grupos experimentais. O teste t independente paramétrico foi utilizado para comparar os grupos contendo polpa descelularizada com o grupo controle. A apresentação gráfica foi realizada utilizando o GraphPad Prism, versão 10.0.0 para Windows. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 CAPÍTULO 1: MANUSCRITO

Artigo produzido para ser submetido na revista: *International Endodontic Journal* (IF: 5.4, A1 CAPES).

Decellularized Extracellular Matrix: New Perspectives for Pulp Regeneration

ABSTRACT

Aim: This study aimed to evaluate the interaction between decellularized dental pulp (DP) tissues, obtained via two decellularization methods, and dental pulp stem cells (DPSCs). DP was tested in two forms: decellularized pulp extracts (DPE) and freeze-dried decellularized pulp (FDP).

Methodology: Third molar pulp tissues were used to prepare decellularized dental pulp and to isolate DPSCs via the explant technique. Decellularization was carried out using two protocols: Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) (M) and Song *et al.* (2017) (S). Decellularization efficiency was confirmed through DAPI staining and DNA extraction. Two types of decellularized pulp products were prepared, yielding the groups DPEM, DPES, FDPM, and FDPS. These groups were analyzed using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF). Cytotoxicity was assessed by MTT assay, and cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). DPSCs proliferation and migration were evaluated using the trypan blue exclusion test and scratch assay, respectively.

Results: MALDI-ToF analysis revealed significant differences in protein profiles between all groups. Although the DPEM group showed initial cytotoxicity, with reduced cell viability at 24h, significant recovery was observed at 48h, suggesting a transient cytotoxic effect. SEM analysis showed cell disruption in the DPEM and DPES groups at 72h, indicating an initial cellular response, but subsequent assays demonstrated cell recovery. All groups exhibited high rates of migration and proliferation, highlighting the lyophilized products that demonstrated the best performances.

Conclusions: Decellularized pulp products demonstrated strong potential for tissue regeneration, despite observed variations. Further research is needed to clarify the underlying

mechanisms and signaling pathways involved.

Keywords: Pulp Regeneration; Decellularization; Extracellular Matrix; Decellularized Pulp.

INTRODUCTION

Pulp tissue is a highly specialized structure composed of a complex extracellular matrix (ECM) that includes collagen, proteoglycans, and fibronectin, which provide structural support. This tissue also contains various cellular components, such as undifferentiated cells, fibroblasts, odontoblasts, immune cells, and endothelial cells, alongside blood vessels and interstitial fluids. The neurovascular bundle formed by nerve fibers and blood vessels mediates the sensory function of the pulp (Rechenberg, Galicia and Peters, 2016). When pulp tissue becomes infected, conventional endodontic treatment is necessary (Zanini, Meyer and Simon, 2017). However, this approach is not suitable for immature permanent teeth with incomplete root development, as it disrupts root formation, especially in cases of infection or trauma (Murray, 2023). In such instances, regenerative endodontic therapies, aimed at promoting pulp tissue regeneration and facilitating complete root development, are crucial (Zaky et al., 2021).

Regenerative strategies typically involve replacing the infected pulp with viable tissue, which can be achieved using scaffolds, growth factors, and stem cells, combined with advanced technologies such as 3D bioprinting, injectable scaffolds, and gene therapy (Gu *et al.*, 2018; Matai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). These technologies not only aim to restore structural integrity but also to reestablish sensory function, mineralized tissue formation, proper vascularization, and nerve regeneration. In this context, scaffolds play a central role in these approaches, providing a three-dimensional structure for supporting undifferentiated cells and facilitating controlled delivery of growth factors. The combination of scaffolds, growth factors, and stem cells creates a favorable environment for cellular development and differentiation, essential for regenerating damaged pulp tissue (Liu et al., 2022; Afzal and Huguet, 2023; Kasravi et al., 2023).

In this context, decellularized ECM (dECM) from dental pulp has gained attention due to its low immunogenicity and high biological activity, making it a promising material for tissue regeneration (Bakhtiar *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2024). The use of dECM scaffolds derived from extracted teeth offers a novel approach to pulp tissue reconstruction (Saldin *et al.*, 2017; Khurshid *et al.*, 2022). Recent studies have demonstrated the ability of dECM to promote

angiogenesis and tissue regeneration, key factors for pulp repair (Bakhtiar et al., 2020; Elnawam et al., 2024).

Previous studies on the proteome of decellularized ECM (dECM) have shown significant differences in protein preservation across protocols. Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) preserved 69.56% of proteins, while Song *et al.* (2017) preserved only 28.26%, highlighting the superior effectiveness of the former in maintaining essential bioactive characteristics for tissue regeneration (Ribeiro *et al.*, 2024). These findings underscore the importance of selecting an effective decellularization method to ensure the quality of scaffolds for pulp regeneration. Therefore, further research is needed to assess the interaction between pulp cells and dECM to evaluate compatibility and potential rejection. This study aims to evaluate the capacity of pulp cells to interact with dECM from dental pulp, obtained through two decellularization methods by Song *et al.* (2017) and Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018), using different presentations. Understanding these interactions will provide insights into the compatibility of dECM for pulp regeneration, paving the way for more effective regenerative treatments.

MATERIALS AND METHODS

Primary culture of pulp cells

Dental pulp stem cells (DPSCs) were obtained from intact third molars of patients aged between 18 and 30 years. Pulpal tissue was fragmented and immersed in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ penicillin (Invitrogen, Grand Island, NY), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (Invitrogen), and 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ glutamine (GIBCO, Grand Island, NY, USA). The *ex-plant* culture was performed in a 6-well plate, incubated at 37 °C with 5% CO₂, and medium changed every 2-3 days (Jiang *et al.*, 2008). Cells were subcultured upon reaching confluence to obtain a sufficient number of cells for the experiment.

Pulp decellularization protocols

Pulp tissues were subjected to two decellularization protocols. The first, described by Song *et al.* (2017), involved immersing pulp tissue in a solution of 0.01 M Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.2, for 48h at 4 °C, followed by incubation in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich) for 24h at 24 °C. Then, tissue was washed three times in 25 mM PBS (Sigma-Aldrich), pH 7.6, for 30 minutes, incubated in 1% Triton X-100

for 24h, followed by three additional washes in PBS and immersion in PBS at 4 °C. The second protocol, from Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018), involved incubating pulp tissue in 10 mM Tris buffer, pH 8.0, with 0.1% EDTA (Sigma-Aldrich) for 24h at 4°C, followed by incubation in 0.03% SDS (Sigma-Aldrich) for 24h at room temperature with constant agitation. Tissue was washed three times in 25 mM PBS (Sigma-Aldrich) and immersed in PBS at 4 °C. After decellularization, tissue was stored at 4 °C for short-term use or at -80 °C for long-term storage (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). The tissues were sterilized by immersion in a PBS solution containing streptomycin at 100 U/mL and 100 mg/mL for a period of 48h (Chen *et al.*, 2015).

Decellularization processes were confirmed by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and residual deoxyribonucleic Acid (DNA) quantification. For DAPI staining, decellularized dental pulp were fixed in 10% formaldehyde for 24h and processed for paraffin embedding and sectioning. Tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a series of ethanol (100%, 95%, and 70%) and distilled water. DAPI staining was performed by incubating the sections in a 0.5 µg/mL DAPI solution for 5-10 minutes, followed by washing in PBS. Then, sections were examined under a fluorescence microscope with a DAPI filter to assess the presence of residual nuclear material. Additionally, residual DNA from the decellularized tissues was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), following the manufacturer's protocol for DNA purification from tissues. Then, residual DNA quantification was performed using a fluorometric method with a Qubit fluorometer (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018, 2020).

Sample preparation

Fragments of decellularized pulps (DPs) were obtained following the protocols of Song *et al.* (2017) (S) and Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) (M). The DPs were finely minced, weighed, and equally distributed into Eppendorf tubes. Two types of preparations were tested: DP extracts (DPE) and freeze-dried DPs (FDP). Samples were then categorized into the following groups: DPEM, DPES, FDPM, and FDPS. For the preparation of DP extracts, the fragments were incubated in DMEM (1 mg/mL) for 72h at 37 °C with constant agitation. After incubation, the sample was centrifuged at 2000 g for 5 minutes, and the supernatant was carefully collected and stored at 4 °C. The DP samples were stored at -80 °C for 24h. Then, frozen fragments were transferred to a vacuum lyophilization chamber, where they were completely lyophilized. Subsequently, the lyophilized material was rehydrated in DMEM for further processing (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2020).

Mass Spectrometry

Extracts and lyophilized DP products were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF/MS) (Autoflex Speed, Bruker Daltonics). Samples were mixed with an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid solution (10 mg/mL) in a proportion of 1:1 or 1:3 and applied onto an MTP AnchorChip 400/384 target plate and let dry at ambient temperature. Spectra were acquired in linear mode in 800 – 20000 m/z range with external calibration using calibration standard I (Bruker Daltonics) and reflected positive mode (700–3500 m/z) with external calibration using peptide calibration standard II (Bruker Daltonics). Spectra were analyzed using the FlexAnalysis Software (Bruker Daltonics, Germany) (Koehbach et al., 2016).

Cytotoxicity assay

Extract and lyophilized DP toxicity were evaluated in DPSC cultures. Initially, DPSCs (1×10^4 cells.mL⁻¹) were cultured in 96-well plates for 24h in a CO₂ incubator at 37 °C. After this period, 200 μ L of the cell supernatant was replaced with the extracts and diluted lyophilized pulp, and the plates were incubated again at 37 °C for 24 and 72h. After the incubation period, an MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was performed, and plates were read at 570 nm. The percentage was calculated by considering the absorbance of the control group as 100% (Mosmann, 1983).

Scanning electron microscopy

The cellular morphology of DPSCs, the topography of the DPs, and the interaction of DPSCs with the DPs and their products were analyzed by scanning electron microscopy (JSM-7000F, JEOL). Glass coverslips (13 mm x 13 mm) were placed in 6-well plates prior to cell culture (2×10^5 cells). After 72h of incubation with 2 mL of DPES, DPEM, FDPM, and FDPS, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde, followed by washing with sodium cacodylate, fixation in 1% osmium tetroxide, and dehydration in acetone. After metallization, samples were analyzed at magnifications of 3000x (Song *et al.*, 2017).

Proliferation assay

Evaluation of the proliferative potential of cells in contact with DPES, DPEM, FDPS,

and FDPM was performed using the Trypan Blue exclusion technique, after 24h and 48h. In 96-well plates, 1×10^4 pulp cells were added in 200 μL of DMEM (Sigma Chemical) without FBS in the control group and the other tested groups. After each experimental period, cells were resuspended, and a 0.4% solution of Trypan Blue dye (Sigma Chemicals) was added for 1 minute (Martin-Piedra *et al.*, 2014). Cells were counted immediately using a Neubauer chamber (Brand GmbH, Wertheim, Germany). Experiments were performed using three technical and biological replicates of each sample and experimental period, and the results were then compared to the initial number of cells.

Cell migration assessment

Cell migration assessment was performed using the scratch method (Ieso, De and Pei, 2018). In this assay, cells (2.5×10^5 cells per well) were seeded in 6-well culture plates (Prolab) in DMEM medium (GIBCO), supplemented with 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ penicillin (Invitrogen) and 100 $\mu\text{g.m}^{-1}$ streptomycin (Invitrogen) and 10% FBS (Cultilab), and maintained until the formation of a confluent monolayer. After the monolayer was formed, some cells were removed from the culture using a plastic micropipette tip with a large hole, simulating a wound. The remaining cells were washed three times with the previously described medium. At this point, the medium used was free of FBS, and DPES, DPEM, FDPS, and FDPM were added. Cultures were incubated and monitored for up to 48h. Photographs were taken using microscopy at 0, 24, and 48h time points for later analysis. Images were processed, and cells located in the wound area were counted using Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Statistical analysis

The experiments were conducted in three technical replicates and repeated at three distinct time points. The normality of all measured variables was tested using the Shapiro-Wilk test. Results were expressed as mean and standard deviation (SD). For statistical analysis, one-way and two-way ANOVA were performed, and whenever necessary, parametric independent t-test was used to compare decellularized pulp with native pulp. Graphical presentation was performed using GraphPad Prism, version 10.0.0 for Windows. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Pulp decellularization

Pulp tissues were subjected to two decellularization protocols following the Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) and Song *et al.* (2017) method (Fig. 1A). DAPI staining revealed a high cellular density in the control tissues (Fig. 1B - a, b, c). In contrast, decellularized tissues showed no visible nuclear material in either protocol (Fig. 1B - d to i). Residual DNA quantification indicated an average of DNA content of 1.4 ng.mg^{-1} in DPS, 1.9 ng.mg^{-1} in DPM, compared to 131 ng.mg^{-1} in the control group. Then, 98% of the native genetic content was removed by decellularization processes (Fig. 1C).

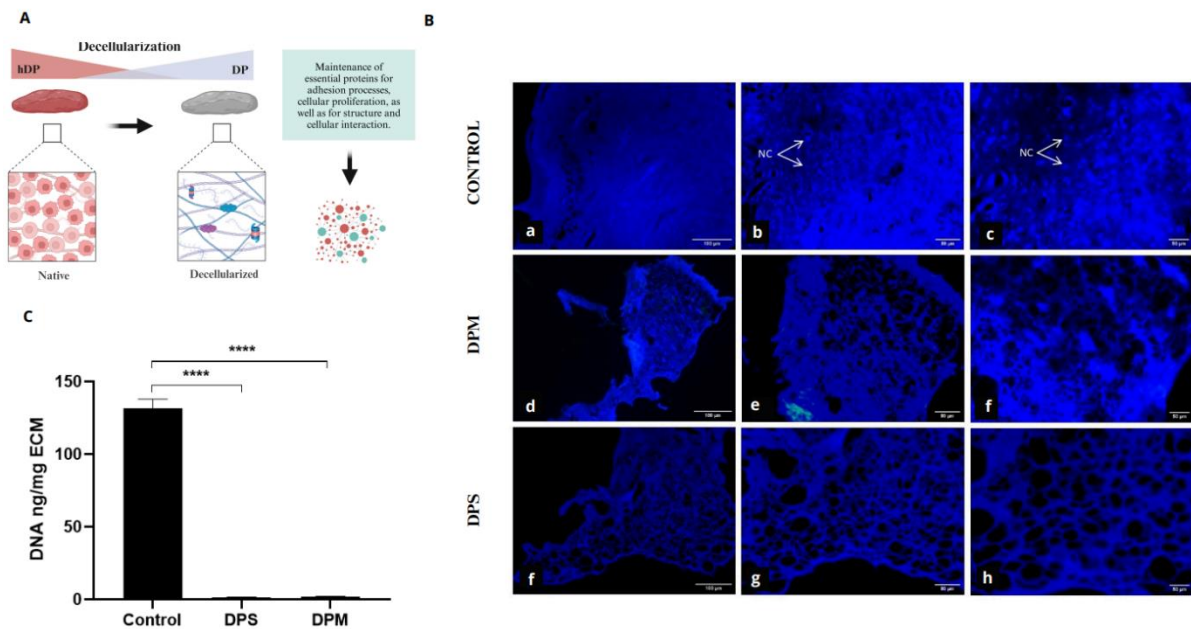


Figure 1. A - Schematic representation of decellularization protocols using Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) and Song *et al.* (2017) published methods. B - Histological sections of human dental pulp (hDP) stained with DAPI: a-c show healthy pulp tissue containing blue, fluorescent nuclei; d-f show decellularized pulp following DPM protocol with no visible nuclei; g-i show decellularized pulp following DPS protocol with no visible nuclei. Scale bar: a-g 100 μm ; b-h 80 μm ; c-i 50 μm . C Average of DNA content (ng/mg of dry tissue) after DNA quantification using a Nanodrop spectrophotometer. ****p < 0.0001, represent statistical difference between groups by t-test.

Mass Spectrometry Profile

After the decellularization process, different DP products were prepared: extracts and lyophilized of DPM and DPS. In order to obtain a profile and compare differences between DP products, MALDI-ToF was employed. Signals at 757 m/z and 801 m/z were detected in DPES, FDPM, and FDPS. A similarity between the DPEM and FDPS groups was also observed, evidenced by the common presence of ions at 861 m/z. However, ions at 2477 m/z and 1239 m/z were exclusively observed in DPEM in the reflected mass analysis and 1268 m/z in the linear mass analysis. In addition, ions at 1839 m/z and 1837 m/z were exclusively observed in

FDPS, in reflected and linear mass analysis, respectively. The masses found in the reflected analysis, with higher resolution, may indicate greater stability of these molecules, while the masses detected in the linear mode may suggest greater aggregation or lower molecular stability, possibly due to interactions with the extracellular matrix or other characteristics of the decellularization process. A higher relative intensity of certain ions was observed, indicating a higher concentration of these molecules in the formulations. These results suggest that the different decellularization protocols influence the molecular composition, which may impact the biological properties of the products.

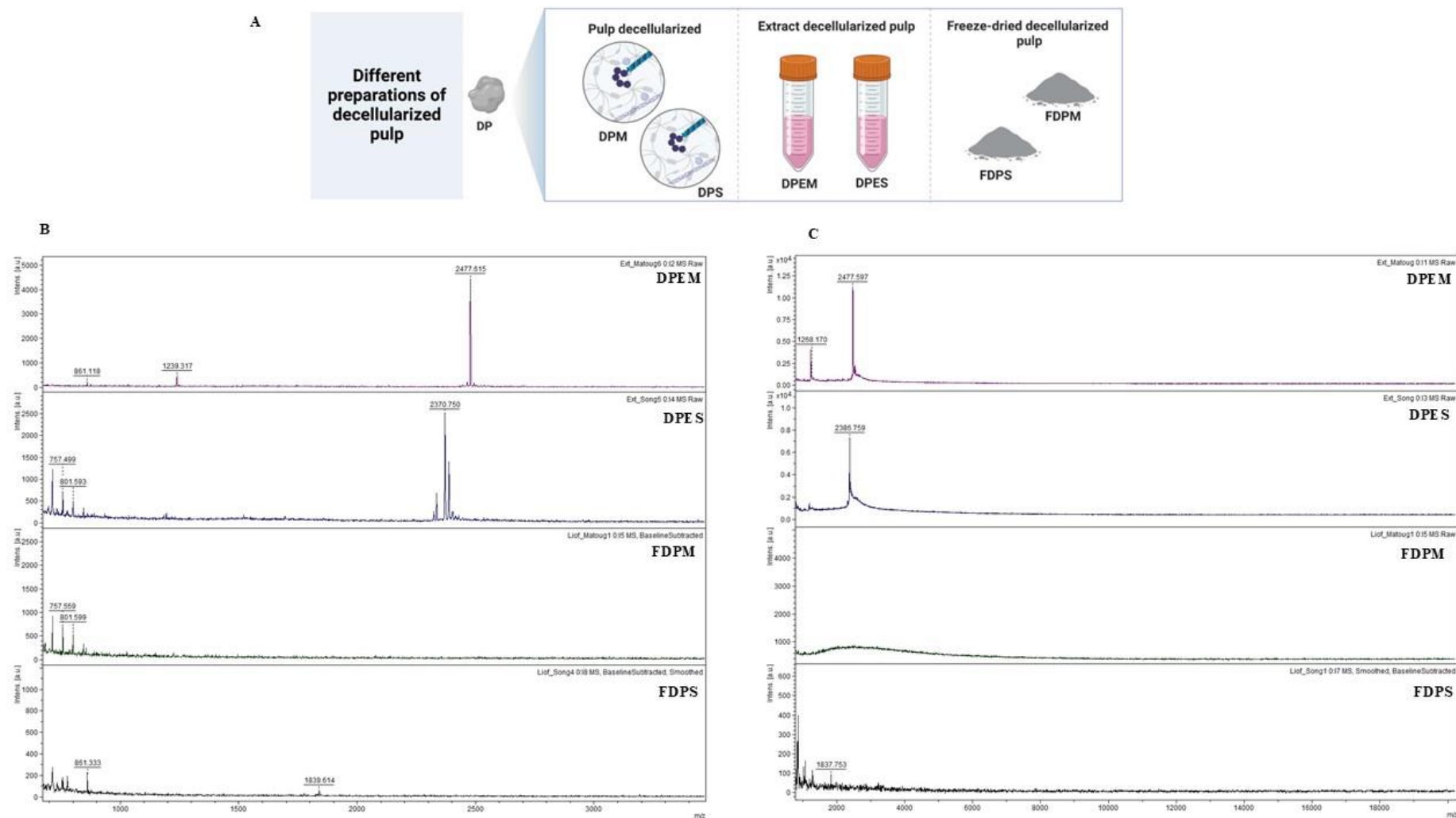


Figure 2. MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight) of DPEM and DPES extracts compared to lyophilized DPs, FDPM and FDPS. (A) Graphical representation of extracts and freeze-dried decellularized pulp. (B) Reflected mode analysis, range of 750 to 3500 m/z; (C) Linear mode analysis, range of 800 to 20000 m/z.

Cytotoxicity Analysis

The viability of DPSCs in contact with DP-derived products was assessed after 24 and 48h of incubation. It was shown that FDPM, FDPS, and DPES did not exhibit cytotoxic effects on DPSCs in either incubation period. However, DPEM exhibited the highest toxicity level, leading to 68% of cell viability after 24h. This result is in accordance with ISO 10993-5, which establishes that products that lead to a reduction in cell viability to values lower than 70% in relation to the control are considered cytotoxic (International Organization for Standardization, 2009; Jablonská *et al.*, 2021). After 48h, an increase in the metabolic activity of DPEM was observed, which could be explained by an initial cellular adaptation. Additionally, a significant increase in metabolic activity was recorded in the presence of DPES, FDPM, and FDPS, with this positive regulation being more pronounced in the FDPM and FDPS-treated groups (Fig. 3).

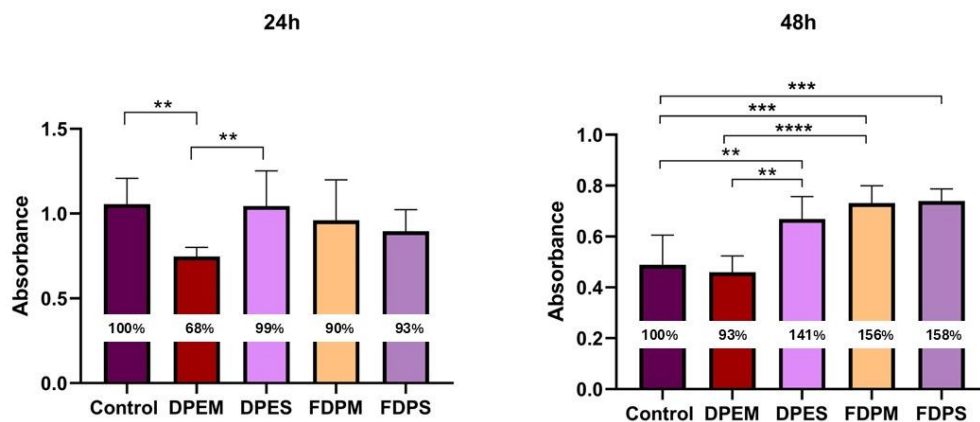


Figure 3. Evaluation of cellular toxicity through metabolic activity in DPSCs in contact with extracts of decellularized dental pulp. Graphs represent the mean of MTT absorbance, in each group: DPEM, DPES, FDPM and FDPS. Values were normalized as percentages, considering control as 100% metabolic activity. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ represent statistical differences between groups by ANOVA.

Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images revealed that hDPSCs in contact with DPS exhibited superior cell adhesion compared to DPM, which showed a higher amount of cellular debris, suggesting lower cell affinity. Additionally, hDPSCs in contact with DPES and FDPS maintained preserved morphology and structural integrity. In contrast, hDPSCs exposed to DPEM and FDPM displayed significant morphological alterations and signs of cell rupture, indicating lower cell affinity and potential structural changes that may compromise cell adhesion (Fig. 4).

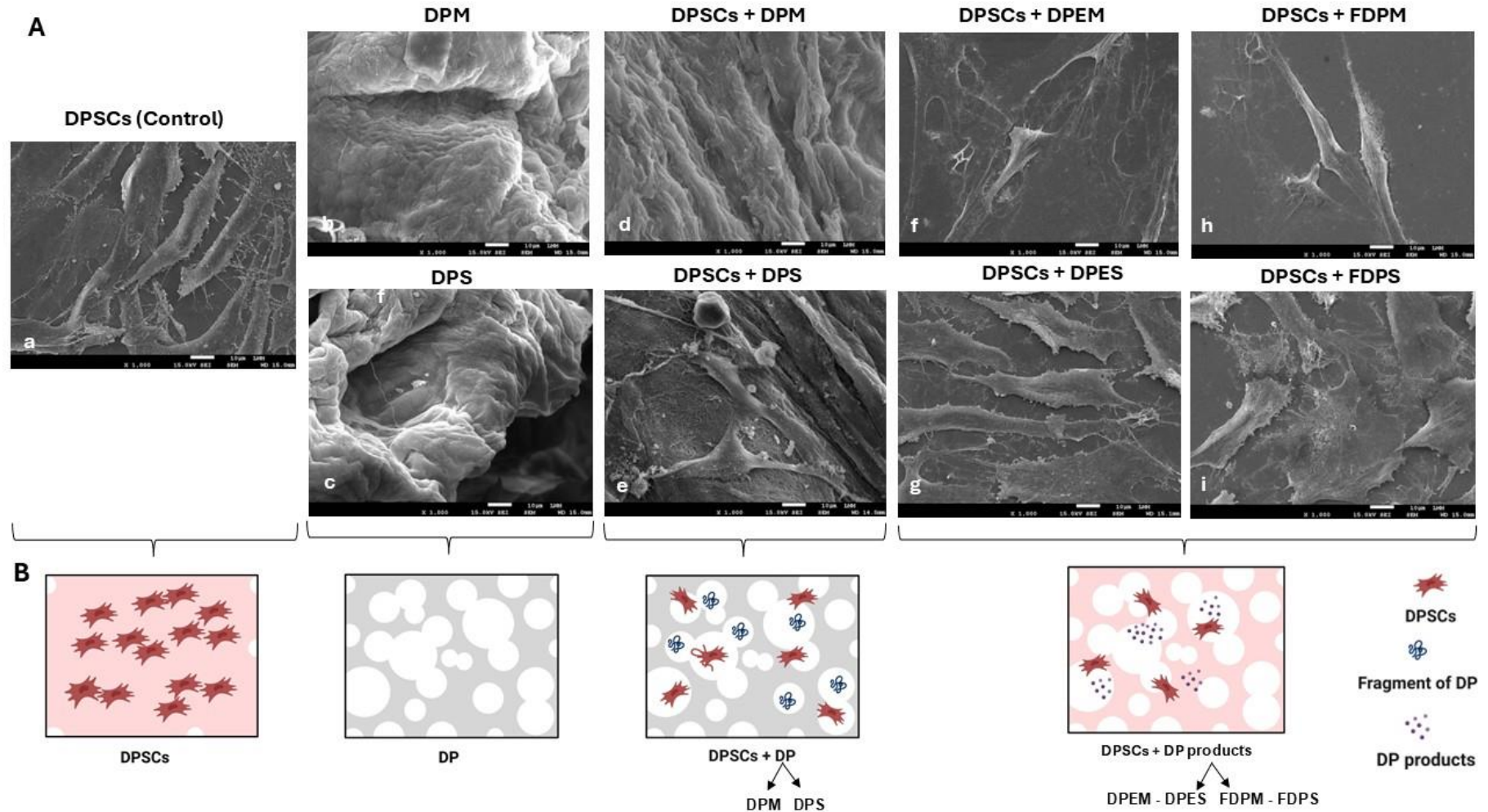


Figure 4. **A** - SEM images of DPSCs under different cell conditions. (a) DPSCs – control group. (b) DPs morphology following the Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) protocol, while (c) shows DPs morphology following the Song *et al.* (2017) protocol. (d - e) Morphology of DPSCs with DPs following the protocols of Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018), and Song *et al.* (2017) respectively. (f) Morphology of DPSCs in contact with DPEM. (g) Morphology of DPSCs in contact with DPEMS. (h) Morphology of DPSCs in contact with FDPM. (i) Morphology of DPSCs in contact with FDPS. **B** - Graphical representation of the possible cellular interaction with the molecules and products released by DPs.

Evaluation of proliferative and migratory potential

The evaluation of the migratory behavior and proliferative potential of dental pulp cells was performed using the scratch migration assay and Trypan Blue exclusion staining, respectively. DPSCs, used at the third passage, were assessed at 24h and 48h. A significant increase in the migratory capacity of the cells was observed after 24 and 48h compared to the control when in contact with the FDPS and FDPM groups. Cells in contact with DPEM did not show significant differences in migration compared to the control. The proliferation assay revealed a significant increase in the proliferative potential of the experimental groups compared to the control, with this increase being more pronounced in the lyophilized groups, which supported the results observed in the migration assay (Fig. 5).

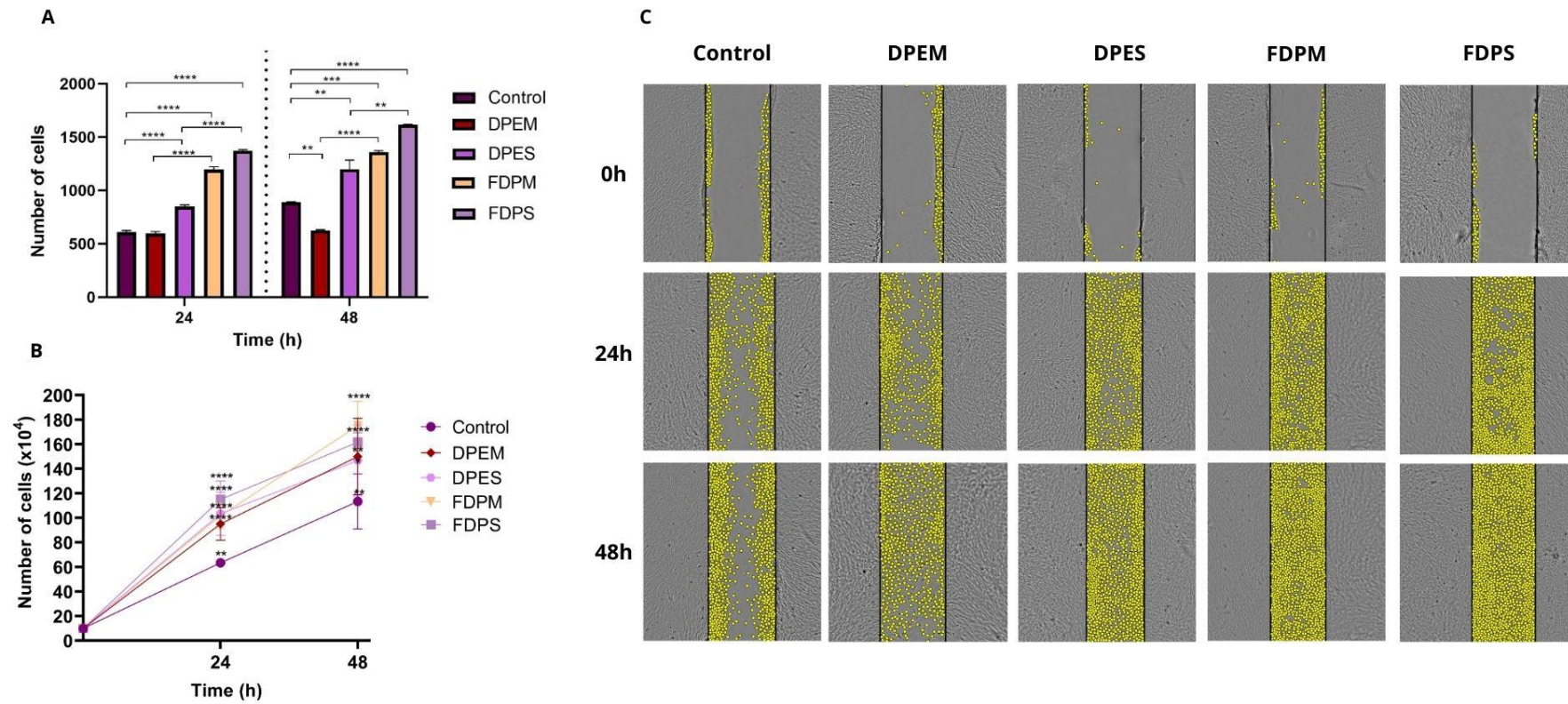


Figure 5. Migration (A) and proliferation (B) rates of hDPSCs in contact with DPEM, DPES, FDPM and FDPS. Graphs were expressed as mean of technical and biological triplicates. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, represent significant differences between groups by ANOVA test. C - Representative images of hDPSCs in different conditions. Yellow dots denote the presence of cells within the wound.

DISCUSSION

Regenerative endodontic procedures combine the use of scaffolds, cells, and growth factors, which are implanted into the pulp cavity of compromised teeth to replace damaged pulp tissue through tissue engineering (Nakashima and Iohara, 2011). Pulpal endodontic regeneration has been extensively investigated in experimental models, both in animals and humans, with the aim of regenerating infected pulp tissue and promoting root development, including increased root thickness and length (Garcia-Godoy and Hargreaves, 2007; Tatullo et al., 2015; He et al., 2017; Matoug-Elwerfelli et al., 2018; Murray). The criteria for success in pulp regeneration vary among clinical trials. According to the clinical guidelines of the American Association of Endodontists (AAE) and European Society of Endodontology (ESE), these criteria include the resolution of clinical symptoms and apical radiolucency, additional root growth, and positive results in pulp vitality tests (Galler, Krastl, et al., 2016; Kim et al., 2018; Botero et al., 2024)

To achieve these objectives, various protocols have been proposed, including different effective scaffolds, disinfection techniques, and sealing materials, emphasizing the need for further investigation (Hodde *et al.*, 2007; Rosario *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2021). The use of scaffolds based on the extracellular matrix (ECM) derived from dental pulp has gained prominence due to its intrinsic potential in tissue engineering. These scaffolds incorporate essential factors that a matrix should contain, including glycoproteins and other bioactive components capable of providing ideal biochemical support for cells, as well as preserving most of the extracellular matrix components from their native tissue. This exhibits unique advantages in promoting tissue regeneration and functional restoration. Their application appears promising due to properties such as cell recruitment, promotion of cellular proliferation and migration, and the release of crucial signaling molecules for tissue regeneration (Goldberg, Njeh and Uzunoglu, 2015; Tiemann et al., 2020; Haugen et al., 2020; Minic et al., 2022;).

Research has explored decellularization protocols in dental pulps from various sources, such as human, bovine, porcine and rat pulp, aiming to identify the best conditions for obtaining functional and safe matrices (Gronthos et al., 2000; Sonoyama et al., 2006; Du et al., 2011; ; Zhou et al., 2011; Traphagen et al., 2012; Gilpin et al., 2014; Hu et al., 2017; Song et al., 2017; Ribeiro et al., 2024;). Rigorous decellularization and crosslinking protocols are essential for

preserving the structural and biochemical integrity of the ECM while eliminating cells and immunogenic components. The development of scaffolds derived from xenogeneic sources, such as bovine pulp, has shown promise not only for their biocompatibility but also as an economical and accessible option for dental pulp regeneration (Elnawam *et al.*, 2024). Meanwhile, rat pulp and human pulp derived from extracted third molars are widely used in experimental studies due to their ease of manipulation and analysis in preclinical models. The scarcity of human and rat dental pulp tissue, along with restrictions on the use of porcine tissues in some countries, represents a significant obstacle to applying these scaffolds in tissue regeneration strategies (Traphagen *et al.*, 2012).

The decellularization protocols adopted, based on the studies of Matoug-Elwerfelli *et al.* (2018) and Song *et al.* (2017), employed combinations of TRIS, TRITON 1x, SDS, and EDTA at different concentrations, ensuring complete cell removal without compromising tissue architecture and maintaining the structural integrity of the matrix (Matoug-Elwerfelli *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). A previous study demonstrated the preservation of essential proteins in these protocols, such as fibrillin (FBN1), which is crucial for cellular proliferation and maintenance; periostin (POSTN), involved in cell adhesion; and type IV collagen, which contributes to the structural stability of the scaffold (Ribeiro *et al.*, 2024). These findings highlight the potential of decellularized pulps as promising biomaterials and raise two central questions: how do these matrices interact with pulp cells and what would be the ideal form of presentation for their application as scaffolds?

Therefore, the interaction of pulp cells with two distinct forms of decellularized pulp products, obtained through different protocols, was investigated. Two presentations of decellularized pulp products were used: decellularized tissue extract and lyophilized dental pulp. The objective was to evaluate the effectiveness of both products and identify the most promising biomaterial for pulp regeneration. After the preparation of DP products, MALDI-ToF mass spectrometry was employed to analyze the differences in the composition of all tested groups. Despite the presence of some ions in all groups, the presence of some exclusive ions was observed in DPEM and FDPS groups. Thus, there is some variation in the composition of each product obtained from pulp decellularization. It is important to highlight that the masses of the proteins present in the extracellular matrix and identified in previous studies (Ribeiro *et al.*, 2024), such as collagen, fibrillin, and periostin, as well as the proteins laminin and fibronectin, are significantly greater. These proteins, already detected after decellularization of

pulp tissues, have masses that make their analysis difficult by linear and reflected mass spectrometry techniques, which typically cover mass ranges of 750 to 3500 m/z and 800 to 20,000 m/z, respectively. As a result, some of these proteins may not be identified by this technique, needing further studies.

According to McInnes and co-workers (2022), molecule masses found in this study may correspond to cryptic peptides, which are bioactive fragments of larger proteins known as matrikines. These peptides, also called crypteins, do not constitute complete proteins by themselves but are bioactive fragments with physiological effects distinct from those of the original protein. In this case, the observed masses are consistent with the masses of elastin, specifically the 0.75 kDa cryptein, which stimulates migratory, proliferative, and morphogenic behaviors of cells, as well as promoting angiogenesis. Additionally, the analysis indicates the presence of type III collagen, exerts a chemotactic effect, increasing the presence of Sox2⁺ and Sca1⁺, Lin[−] cells at the injury site, influencing osteogenesis and bone remodeling (McInnes, Moser and Chen, 2022). These results demonstrate the relevance of cryptic peptides as important components of the cryptome, which significantly influence cellular physiology and are crucial for tissue regeneration and remodeling processes, reinforcing the potential of DPs as biomaterials in tissue engineering.

In this context, both the liquid solution and the lyophilized product emerge as promising strategies, offering versatility and suitability for various clinical needs, thus expanding the possibilities for practical application in regenerative dentistry. Considering that these tissues no longer contain genetic material that could interfere with the immunogenicity process and that mass spectrometry revealed distinct profiles in the different presentations, a crucial point to evaluate is the presence or absence of cytotoxicity of the extracellular matrix in contact with cells (Bakhtiar *et al.*, 2020). Cytotoxicity can be influenced by insufficient cell removal or the presence of chemical residues from the reagents used during the decellularization process, which may negatively impact the interaction of the ECM with cells. In this study, both formulations – liquid extract and lyophilized product – showed no cytotoxicity after 48h and promoted a significant increase in cellular metabolic activity. Although the DPEM group exhibited an initial decrease in cell viability, significant recovery was observed after 48h, indicating the cells' ability to overcome the initial stress and restore their functionality. The elevated activity of mitochondrial enzymes is often associated with increased energy production in cells, which is crucial for cell differentiation and regeneration (Popov, 2020;

Ward and Thompson, 2012). These findings align with other studies that have also reported similar effects using decellularized dental pulps, reinforcing the potential of these scaffolds for tissue regeneration applications (Bakhtiar et al., 2020; Matoug-Elwerfelli et al., 2020; Song et al., 2017).

Once the absence of toxicity was confirmed, the next goal was to investigate how DPSCs would interact with the structure of decellularized pulps in their different presentations. A previous study observed a dense extracellular matrix network and found a reduction in collagen in the Song *et al.* (2018) protocol, compared to the Matoug-Ewerfelli (2018) protocol SEM images (Ribeiro *et al.*, 2024). These results reinforce the hypothesis that the Matoug-Ewerfelli *et al.* (2018) protocol is less aggressive, resulting in a more preserved extracellular matrix, which was also observed in this study. The presence of a porous structure in DPs may facilitate cell adhesion, providing an adequate environment for cell growth and proliferation, as also observed in the presence of DP products: extract or lyophilized forms. Moreover, tissue products possibly released in the extract or presented in the lyophilized dental pulp may play a fundamental role in this process, as they possess bioactive characteristics that favor cell adhesion and interaction with decellularized pulp. These findings are consistent with the literature, which indicates that the three-dimensional structure of extracellular matrices, combined with bioactive proteins, can enhance tissue regeneration by promoting a favorable environment for cell adhesion and differentiation (Wang et al., 2014; Omid et al., 2020).

These results are also in accordance with those found in the cell viability assay, which indicate an increase in cellular metabolic activity. This suggests that the matrices not only facilitate adhesion but also create ideal conditions for cell differentiation and regeneration, providing the essential energy required for these processes. SEM and MALDI tests provided key insights into the impact of different extracts on cell cultures. SEM revealed morphological changes, such as cell ruptures, indicating initial cellular responses to the DP products. In contrast, MALDI mass spectrometry highlighted significant differences in protein profiles, particularly in DPEM, which, despite initial toxicity, showed cellular adaptation over time. These analyses offer complementary data critical for evaluating the biological effects of the extracts and their potential in tissue regeneration.

The migration assay demonstrated that cells in contact with DPEM maintained a migratory capacity similar to that of the control group, despite the initial cytotoxicity observed. This preservation suggests the activation of cellular recovery mechanisms over time, allowing

the restoration of cell viability and functionality. Therefore, although DPEM induces initial stress, the cells seem to adapt and recover their functional capacity, ensuring the maintenance of cellular migration.

This study demonstrated the high efficacy of products derived from decellularized dental pulp, highlighting their crucial role in pulp regeneration. While all groups showed positive responses, the freeze-dried dental pulp products (FDPS and FDPM) stood out with superior results, exhibiting greater performance compared to the other extracts. These findings suggest that freeze-drying may be an effective approach for preserving the biological properties of decellularized dental pulp, enhancing its therapeutic effects. These results open the door for further studies and the potential integration of these products into clinical practice.

However, for this approach to be widely integrated into clinical practice, further research is needed to improve the mechanical properties of scaffolds, such as stiffness, viscoelasticity, and biodegradability, as well as to enhance sterilization methods to ensure that scaffolds maintain their biocompatible and functional properties over time, ensuring their viability and success in clinical applications (Moussa and Aparicio, 2018, 2019; Kasravi et al., 2023; Matichescu et al., 2020). The incorporation of additional modifiers or the combination of different types of scaffolds could be an effective strategy to optimize these characteristics, resulting in hybrid materials with enhanced properties for pulp regeneration. Furthermore, validating these scaffolds in preclinical models and conducting long-term studies will be crucial to ensure their applicability in real clinical scenarios. With effective protocols and adjustments to scaffold properties, the decellularization of bovine, porcine, and human dental pulp could become a viable and accessible solution for pulp regeneration, particularly due to its ability to generate a significant amount of material, opening new perspectives for more efficient and less invasive treatments in the future (; Sonoyama et al., 2006; Kim et al., 2010; Hu et al., 2017; Lee et al., 2020; Ribeiro et al., 2024).

CONCLUSION

The decellularized dental pulp products, such as extracts and lyophilized pulp, demonstrated low or no cytotoxicity and a significant increase in cellular metabolic activity, reinforcing their viability as biomaterials. DPEM exhibited initial cytotoxicity, with reduced

cell viability during the first 24h, but a significant recovery after 48h, suggesting a transient toxic effect. On the other hand, the lyophilized products, such as FDPS and FDPM, showed no cytotoxicity and stood out for their greater stability and performance, indicating that lyophilized pulp may be more suitable for clinical application. These results highlight the therapeutic potential of these products for tissue engineering and regenerative dentistry. However, further studies are needed to better understand the mechanisms of action and signaling pathways involved in the cellular response to these biomaterials.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305242/2022-9 and 88887.724454/2022-00), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (88887.724415/2022-00), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (00193– 00000782/2021-63 and 00193-00001118/2021- 31).

REFERENCES

- AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68–82, abr. 2016.
- ADANIR, N.; KHURSHID, Z.; RATNAYAKE, J. The Regenerative Potential of Decellularized Dental Pulp Extracellular Matrix: A Systematic Review. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 18, 14 set. 2022.
- AFZAL, Z.; HUGUET, E. L. Bioengineering liver tissue by repopulation of decellularised scaffolds. **World journal of hepatology**, v. 15, n. 2, p. 151–179, 27 fev. 2023.
- AHMADIAN, E. *et al.* The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 245–254, nov. 2019.
- AHMED, E.; SALEH, T.; XU, M. Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, v. 10, n. 7, 15 jul. 2021.
- ALAGL, A. *et al.* Use of platelet-rich plasma for regeneration in non-vital immature permanent teeth: Clinical and cone-beam computed tomography evaluation. **Journal of**

International Medical Research, v. 45, n. 2, p. 583–593, 23 abr. 2017.

ALGHUTAIMEL, H. *et al.* Investigating the vascularization capacity of a decellularized dental pulp matrix seeded with human dental pulp stem cells: *in vitro* and preliminary *in vivo* evaluations. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 8, p. 1300–1316, 5 ago. 2021.

AL-HAKIM KHALAK, F. *et al.* Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for Tendon Regeneration in Three-Dimensional Bioprinting. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, 26 out. 2022.

ALHOWAISH, N. A. *et al.* Histological Evaluation of Restylane Lyft Used as a Scaffold for Dental Pulp Regeneration in Non-Infected Immature Teeth in Dogs. **Materials**, v. 15, n. 12, p. 4095, 9 jun. 2022.

ALHOWAISH, N. A.; ALSUDANI, D. I.; ALMURAIKHI, N. A. Evaluation of a hyaluronic acid hydrogel (Restylane Lyft) as a scaffold for dental pulp regeneration in a regenerative endodontic organotype model. **Odontology**, v. 110, n. 4, p. 726–734, 26 out. 2022.

ALMEIDA, G. H. D. R. *et al.* Perfusion and Ultrasonication Produce a Decellularized Porcine Whole-Ovary Scaffold with a Preserved Microarchitecture. **Cells**, v. 12, n. 14, 15 jul. 2023.

ALQAHTANI, Q. *et al.* Decellularized Swine Dental Pulp Tissue for Regenerative Root Canal Therapy. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 13, p. 1460–1467, 1 dez. 2018.

ASHIRY, E. A. EL *et al.* Dental Pulp Revascularization of Necrotic Permanent Teeth with Immature Apices. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 40, n. 5, p. 361–366, 1 jun. 2016.

BAKHTIAR, H. *et al.* Second-generation Platelet Concentrate (Platelet-rich Fibrin) as a Scaffold in Regenerative Endodontics: A Case Series. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 401–408, mar. 2017.

_____. Pulp ECM-derived macroporous scaffolds for stimulation of dental-pulp regeneration process. **Dental Materials**, v. 36, n. 1, p. 76–87, jan. 2020.

_____. Human amniotic membrane extracellular matrix scaffold for dental pulp regeneration *in vitro* and *in vivo*. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 4, p. 374–390, 29 abr. 2022.

BEZGIN, T. *et al.* Efficacy of Platelet-rich Plasma as a Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 36–44, jan. 2015.

BOTERO, T. *et al.* Web-Based Survey on Regenerative Endodontic Practices among Members of the American Association of Endodontists. **Journal of Endodontics**, v. 50, n. 9,

p. 1281–1288, set. 2024.

BRIZUELA, C. *et al.* The Four Pillars for Successful Regenerative Therapy in Endodontics: Stem Cells, Biomaterials, Growth Factors, and Their Synergistic Interactions. **Stem Cells International**, v. 2022, p. 1–17, 19 set. 2022.

BROWN, M. *et al.* Decellularized extracellular matrix: New promising and challenging biomaterials for regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 289, p. 121786, out. 2022.

CAEIRO-VILLASENÍN, L. *et al.* Developmental Dental Defects in Permanent Teeth Resulting from Trauma in Primary Dentition: A Systematic Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 2, 10 jan. 2022.

CALLE, E. A. *et al.* Targeted proteomics effectively quantifies differences between native lung and detergent-decellularized lung extracellular matrices. **Acta biomaterialia**, v. 46, p. 91–100, dez. 2016.

CAPELLA-MONSONÍS, H. *et al.* Extracellular matrix-based biomaterials as adipose-derived stem cell delivery vehicles in wound healing: a comparative study between a collagen scaffold and two xenografts. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 510, 27 nov. 2020.

CHEN, G. *et al.* Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. **Biomaterials**, v. 52, p. 56–70, jun. 2015.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 462–84, 2014.

CHOI, J. S. *et al.* In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 1–2, p. 80–92, jan. 2012.

ÇİÇEK, E. *et al.* Effect of Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug Thickness on Fracture Resistance of Immature Teeth. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1697–1700, out. 2017.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011.

CROWLEY, L. C. *et al.* Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 7, 1 jul. 2016.

DAS, T. *et al.* Influence of Calcium in Extracellular DNA Mediated Bacterial Aggregation and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91935, 20 mar. 2014.

DAYI, B. *et al.* Evaluation of a collagen-bioaggregate composite scaffold in the repair

of sheep pulp tissue. **European Oral Research**, v. 0, n. 0, p. 152–161, 25 maio 2021.

DU, L. *et al.* Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. **The British journal of ophthalmology**, v. 95, n. 3, p. 410–4, mar. 2011.

ELNAWAM, H. *et al.* Bovine pulp extracellular matrix hydrogel for regenerative endodontic applications: in vitro characterization and in vivo analysis in a necrotic tooth model. **Head & face medicine**, v. 20, n. 1, p. 61, 22 out. 2024.

FARGES, J.-C. *et al.* Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 230251, 2015.

FREEMAN, F. E. *et al.* Biofabrication of multiscale bone extracellular matrix scaffolds for bone tissue engineering. **European cells & materials**, v. 38, p. 168–187, 11 out. 2019.

FU, J. *et al.* Laminin-Modified Dental Pulp Extracellular Matrix for Dental Pulp Regeneration. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 595096, 2020.

FU, Y. *et al.* Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. **Cells, tissues, organs**, v. 191, n. 3, p. 193–202, 2010.

GALLER, K. M. *et al.* European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 8, p. 717–723, 23 ago. 2016.

GIBBISON, R.; CROZIER, R. Does primary trauma lead to developmental defects in permanent teeth? **Evidence-based dentistry**, v. 23, n. 3, p. 112–113, set. 2022.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

GILPIN, S. E. *et al.* Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 33, n. 3, p. 298–308, mar. 2014.

GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GONÇALVES DA COSTA SOUSA, M. *et al.* Antibiofilm and immunomodulatory resorbable nanofibrous filing for dental pulp regenerative procedures. **Bioactive Materials**, v. 16, p. 173–186, out. 2022.

GRANZ, C. L.; GORJI, A. Dental stem cells: The role of biomaterials and scaffolds in developing novel therapeutic strategies. **World journal of stem cells**, v. 12, n. 9, p. 897–921,

26 set. 2020.

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–30, 5 dez. 2000.

GU, B. K. *et al.* 3D Bioprinting Technologies for Tissue Engineering Applications. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1078, p. 15–28, 2018.

GUNGOR-OZKERIM, P. S. *et al.* Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials science**, v. 6, n. 5, p. 915–946, 1 maio 2018.

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C.; DHASMANA, A. Erratum to: Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1577, p. 337, 2018.

HASEGAWA, M. *et al.* Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. **Tissue engineering**, v. 11, n. 3–4, p. 469–78, [s.d.].

HAUGEN, H. J. *et al.* Injectable Biomaterials for Dental Tissue Regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, 13 maio 2020.

HE, L. *et al.* Regenerative Endodontics by Cell Homing. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 1, p. 143–159, jan. 2017.

HODDE, J. *et al.* Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 4, p. 537–43, abr. 2007.

HU, L. *et al.* Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017a.

_____. Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017b.

HUANG, Q. *et al.* Use of peracetic acid to sterilize human donor skin for production of acellular dermal matrices for clinical use. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 12, n. 3, p. 276–87, 2004.

HUANG, Z.; GODKIN, O.; SCHULZE-TANZIL, G. The Challenge in Using Mesenchymal Stromal Cells for Recellularization of Decellularized Cartilage. **Stem cell reviews and reports**, v. 13, n. 1, p. 50–67, fev. 2017.

IESO, M. L. DE; PEI, J. V. An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. **Bioscience reports**, v. 38, n.

5, 31 out. 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** Geneva, Switzerland: [s.n.].

INUUYAMA, Y. *et al.* Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 92B, n. 1, p. 120–128, 2 jan. 2010.

ISHIMATSU, H. *et al.* Formation of Dentinal Bridge on Surface of Regenerated Dental Pulp in Dentin Defects by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2 From Gelatin Hydrogels. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 6, p. 858–865, jun. 2009.

JABLONSKÁ, E. *et al.* Test conditions can significantly affect the results of in vitro cytotoxicity testing of degradable metallic biomaterials. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 6628, 23 mar. 2021.

JIANG, L. *et al.* The Expression and Role of Stromal Cell-derived Factor-1 α -CXCR4 Axis in Human Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 939–944, ago. 2008.

JIANG, Y. *et al.* Extracellular matrix grafts: From preparation to application (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 47, n. 2, p. 463–474, fev. 2021.

KANNO, K. *et al.* Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4-interleukin-1R signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 312, 21 out. 2020.

KARAMANOS, N. K. *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS journal**, v. 288, n. 24, p. 6850–6912, dez. 2021.

KARAMIFAR, K.; TONDARI, A.; SAGHIRI, M. A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. **European endodontic journal**, v. 5, n. 2, p. 54–67, 2020.

KASRAVI, M. *et al.* Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials research**, v. 27, n. 1, p. 10, 9 fev. 2023a.

_____. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials research**, v. 27, n. 1, p. 10, 9 fev. 2023b.

KAVITHA, M. *et al.* Comparative Evaluation of Platelet-rich Fibrin and Concentrated Growth Factor as Scaffolds in Regenerative Endodontic Procedure: A Randomized Controlled Clinical Trial. **The journal of contemporary dental practice**, v. 23, n. 12, p. 1211–1217, 1

dez. 2022.

KHORASANI, M. M. Y. *et al.* Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. **Cytokine**, v. 126, p. 154896, fev. 2020.

KHURSHID, Z. *et al.* Future of Decellularized Dental Pulp Matrix in Regenerative Endodontics. **European journal of dentistry**, v. 16, n. 4, p. 737–741, out. 2022a.

_____. Future of Decellularized Dental Pulp Matrix in Regenerative Endodontics. **European Journal of Dentistry**, v. 16, n. 04, p. 737–741, 6 out. 2022b.

KIKUCHI, N. *et al.* Formation of Dentin-like Particles in Dentin Defects above Exposed Pulp by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor 2 from Gelatin Hydrogels. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 10, p. 1198–1202, out. 2007.

KIM, B. S. *et al.* Decellularized extracellular matrix: a step towards the next generation source for bioink manufacturing. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 034104, 4 ago. 2017.

KIM, J. Y. *et al.* Regeneration of Dental-Pulp-like Tissue by Chemotaxis-Induced Cell Homing. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 10, p. 3023–3031, out. 2010.

KIM, S. G. *et al.* Regenerative endodontics: a comprehensive review. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 12, p. 1367–1388, 11 dez. 2018.

KOEHBACH, J. *et al.* MALDI TOF/TOF-Based Approach for the Identification of d-Amino Acids in Biologically Active Peptides and Proteins. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 5, p. 1487–96, 6 maio 2016.

KOKKAS, A. *et al.* The role of cytokines in pulp inflammation. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 25, n. 3, p. 303–11, 2011.

KWON, Y. S. *et al.* Behaviour of human dental pulp cells cultured in a collagen hydrogel scaffold cross-linked with cinnamaldehyde. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 1, p. 58–66, 6 jan. 2017.

LEE, D. J. *et al.* Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. **Journal of tissue engineering**, v. 7, p. 2041731416680306, 2016.

_____. Decellularized pulp matrix as scaffold for mesenchymal stem cell mediated bone regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 11, p. 204173142098167, 17 jan. 2020.

LI, L. *et al.* Decellularized extracellular matrix loaded with IPFP-SC for repairing rabbit osteochondral defects. **American journal of translational research**, v. 13, n. 10, p. 11026–11047, 2021.

LI, T.; JAVED, R.; AO, Q. Xenogeneic Decellularized Extracellular Matrix-based Biomaterials For Peripheral Nerve Repair and Regeneration. **Current neuropharmacology**, v. 19, n. 12, p. 2152–2163, 2021.

LIANG, C.; LIAO, L.; TIAN, W. Advances Focusing on the Application of Decellularized Extracellular Matrix in Periodontal Regeneration. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, 14 abr. 2023.

LIU, C. *et al.* Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56–82, fev. 2022a.

_____. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56–82, fev. 2022b.

LIU, X. *et al.* Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve. **Xenotransplantation**, v. 25, n. 2, 15 mar. 2018.

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**, v. 4, n. 4, p. 808–16, jul. 2008.

MACRIN, D. *et al.* Metabolism as an early predictor of DPSCs aging. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2195, 18 dez. 2019.

MARTIN-PIEDRA, M. A. *et al.* Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 266–277, fev. 2014.

MATAI, I. *et al.* Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, v. 226, p. 119536, jan. 2020.

MATICHESCU, A. *et al.* Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration—A Review. **Materials**, v. 13, n. 22, p. 5303, 23 nov. 2020.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 6, p. 663–673, jun. 2018.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 6, p. 663–673, 16 jun. 2018.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* Ex-vivo recellularisation and stem cell differentiation of a decellularised rat dental pulp matrix. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 21553, 2020a.

_____. Ex-vivo recellularisation and stem cell differentiation of a decellularised rat dental pulp matrix. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21553, 9 dez. 2020b.

MATTEI, V. *et al.* Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect? **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 5, p. 1635–1646, 7

out. 2021.

MCINNES, A. D.; MOSER, M. A. J.; CHEN, X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. **Journal of functional biomaterials**, v. 13, n. 4, 14 nov. 2022a.

_____. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. **Journal of functional biomaterials**, v. 13, n. 4, 14 nov. 2022b.

MEHBOOB, R. *et al.* Enhanced Neurokinin-1 Receptor Expression Is Associated with Human Dental Pulp Inflammation and Pain Severity. **BioMed research international**, v. 2021, p. 5593520, 2021.

MINIC, S. *et al.* Tissue Characteristics in Endodontic Regeneration: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10534, 11 set. 2022.

MITSIADIS, T. A.; MAGLOIRE, H.; PAGELLA, P. Nerve growth factor signalling in pathology and regeneration of human teeth. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1327, 2 dez. 2017.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807–12, 13 maio 2003.

MOHITE, P. *et al.* Comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine apical plug thickness on fracture resistance of immature teeth: An In vitro study. **Annals of African medicine**, v. 21, n. 3, p. 198–203, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOUSSA, D. G.; APARICIO, C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. term.2769, 17 dez. 2018.

MOUSSA, D. G.; APARICIO, C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 13, n. 1, p. 58–75, jan. 2019.

MUNCIE, J. M.; WEAVER, V. M. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. **Current topics in developmental biology**, v. 130, p. 1–37, 2018.

MUÑOZ-CARRILLO, J. L. *et al.* The Role of microRNAs in Pulp Inflammation. **Cells**, v. 10, n. 8, 2021.

MURRAY, P. E. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical

Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 11 out. 2018.

_____. Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. S2, p. 188–199, 15 mar. 2023.

MURRAY, P. E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K. M. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 4, p. 377–390, abr. 2007.

NAKASHIMA, M.; IOHARA, K. Regeneration of Dental Pulp by Stem Cells. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 313–319, 15 jul. 2011.

NEVE, A. *et al.* Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. **BioMed research international**, v. 2014, p. 756078, 2014.

NICOLOSO, G. F. *et al.* A comparative evaluation of endodontic treatments for immature necrotic permanent teeth based on clinical and radiographic outcomes: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, n. 3, p. 217–227, 16 maio 2017.

_____. Pulp Revascularization or Apexification for the Treatment of Immature Necrotic Permanent Teeth: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 43, n. 5, p. 305–313, 1 jan. 2019.

OHATA, K.; OTT, H. C. Human-scale lung regeneration based on decellularized matrix scaffolds as a biologic platform. **Surgery today**, v. 50, n. 7, p. 633–643, jul. 2020.

OMIDI, S. *et al.* The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 23, n. 6, p. 768–775, jun. 2020.

PANJWANI, P. *et al.* The effect of varying thicknesses of mineral trioxide aggregate (MTA) and Biodentine as apical plugs on the fracture resistance of teeth with simulated open apices: a comparative in vitro study. **PeerJ**, v. 12, p. e18691, 2024.

PARK, W.; GAO, G.; CHO, D.-W. Tissue-Specific Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for Musculoskeletal Tissue Regeneration and Modeling Using 3D Bioprinting Technology. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, 22 jul. 2021.

PATI, F. *et al.* Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature communications**, v. 5, p. 3935, 2 jun. 2014a.

_____. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular

matrix bioink. **Nature communications**, v. 5, p. 3935, 2 jun. 2014b.

PIGEOT, S. *et al.* Orthotopic Bone Formation by Streamlined Engineering and Devitalization of Human Hypertrophic Cartilage. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, 30 set. 2020.

POPOV, L.-D. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, maio 2020.

RAMM, R. *et al.* Decellularization combined with enzymatic removal of N-linked glycans and residual DNA reduces inflammatory response and improves performance of porcine xenogeneic pulmonary heart valves in an ovine in vivo model. **Xenotransplantation**, v. 27, n. 2, 26 mar. 2020.

RAVINDRAN, S.; HUANG, C.-C.; GEORGE, A. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2014a.

_____. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2014b.

RECHENBERG, D.-K.; GALICIA, J. C.; PETERS, O. A. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0167289, 2016a.

_____. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0167289, 2016b.

RIBEIRO, V. M. DOS S. *et al.* Histologic and proteomic profile of two methods to decellularize human dental pulp tissue. **Archives of Oral Biology**, v. 157, p. 105847, jan. 2024.

RODERJAN, J. G. *et al.* Structural assessments in decellularized extracellular matrix of porcine semilunar heart valves: Evaluation of cell niches. **Xenotransplantation**, v. 26, n. 3, p. e12503, maio 2019.

ROSARIO, D. J. *et al.* Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. **Regenerative medicine**, v. 3, n. 2, p. 145–56, mar. 2008.

ROWLEY, A. T. *et al.* Extracellular Matrix-Based Strategies for Immunomodulatory Biomaterials Engineering. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 8, p. e1801578, abr. 2019.

SALDIN, L. T. *et al.* Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 1–15, fev. 2017.

SANTIS, M. M. DE *et al.* Extracellular-Matrix-Reinforced Bioinks for 3D Bioprinting Human Tissue. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 33, n. 3, p. e2005476, jan.

2021.

SASSI, L. *et al.* A Perfusion Bioreactor for Longitudinal Monitoring of Bioengineered Liver Constructs. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, 21 jan. 2021.

SEIF-NARAGHI, S. B. *et al.* Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. **Science translational medicine**, v. 5, n. 173, p. 173ra25, 20 fev. 2013.

SINGELYN, J. M. *et al.* Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 8, p. 751–63, 21 fev. 2012.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 397–419, 10 nov. 2010.

SOARES, D. G. *et al.* Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 9, p. 2827–2839, 9 dez. 2017.

SONG, J. S. *et al.* Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 6, p. 640–646, 14 jun. 2017.

SONOYAMA, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PloS one**, v. 1, p. e79, 20 dez. 2006.

TAO, M. *et al.* Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 9, p. 2927–2945, set. 2021.

TATULLO, M. *et al.* Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1205–1216, nov. 2015.

TCHOUKALOVA, Y. D. *et al.* Tracheal decellularization using a combination of chemical, physical and bioreactor methods. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 2, p. 100–107, 28 fev. 2018.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4–27, 1 fev. 2016.

TIEMANN, T. T. *et al.* Towards uterus tissue engineering: a comparative study of sheep uterus decellularisation. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 167–178, 26 mar. 2020.

TONG, H. J. *et al.* Deep dentine caries management of immature permanent posterior teeth with vital pulp: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 124, p. 104214, set. 2022.

TRAPHAGEN, S. B. *et al.* Characterization of natural, decellularized and reseeded porcine tooth bud matrices. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p. 5287–96, jul. 2012.

UZARSKI, J. S. *et al.* Sustained in vivo perfusion of a re-endothelialized tissue engineered kidney graft in a human-scale animal model. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 11, p. 1184408, 2023.

VASEENON, S. The Observation of Inflammation, Oxidative Stress, Mitochondrial Dynamics, and Apoptosis in Dental Pulp following a Diagnosis of Irreversible Pulpitis. **European Endodontic Journal**, 2022.

WACHS, R. A. *et al.* Apoptosis-Decellularized Peripheral Nerve Scaffold Allows Regeneration across Nerve Gap. **Cells Tissues Organs**, p. 1–11, 26 ago. 2022.

WANG, X. *et al.* Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 4, p. 1017–1025, 4 abr. 2014.

WANG, Y. *et al.* Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. **Xenotransplantation**, v. 22, n. 1, p. 48–61, 7 jan. 2015.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Signaling in control of cell growth and metabolism. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 7, p. a006783, 1 jul. 2012.

WASSENAAR, J. W. *et al.* Evidence for Mechanisms Underlying the Functional Benefits of a Myocardial Matrix Hydrogel for Post-MI Treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 9, p. 1074–1086, 8 mar. 2016.

WHITE, L. J. *et al.* The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta biomaterialia**, v. 50, p. 207–219, 1 mar. 2017.

WIGLER, R. *et al.* Revascularization: A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 319–326, mar. 2013.

YANG, J.; DANG, H.; XU, Y. Recent advancement of decellularization extracellular matrix for tissue engineering and biomedical application. **Artificial Organs**, v. 46, n. 4, p. 549–567, abr. 2022.

YANG, Y. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and

in vivo. **Acta biomaterialia**, v. 69, p. 71–82, 15 mar. 2018.

YAO, Q. *et al.* Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 104, p. 109942, nov. 2019.

YU, C.; ABBOTT, P. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Australian Dental Journal**, v. 52, n. s1, 12 mar. 2007.

YUE, W. *et al.* Differential Protein Expression in Human Dental Pulp: Comparison of Healthy, Inflamed, and Traumatic Pulp. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 8, 16 ago. 2019.

ZAKY, S. H. *et al.* The role of inflammation modulation in dental pulp regeneration. **European cells & materials**, v. 41, p. 184–193, 14 fev. 2021.

ZANARDO, T. É. C. *et al.* Decellularized Splenic Matrix as a Scaffold for Spleen Bioengineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 573461, 2020.

ZANINI, M.; MEYER, E.; SIMON, S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 7, p. 1033–1051, jul. 2017a.

_____. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 7, p. 1033–1051, jul. 2017b.

ZHAN, C. *et al.* Dental nerves: a neglected mediator of pulpitis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 1, p. 85–99, 26 jan. 2021.

ZHANG, J. *et al.* 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, 12 abr. 2021.

ZHANG, W. *et al.* Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 5, p. 516–523, 24 maio 2017.

ZHANG, X. *et al.* Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. **Bioactive materials**, v. 10, p. 15–31, abr. 2022.

ZHE, M. *et al.* Recent Advances in Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 8, 18 abr. 2023.

ZHOU, Y. *et al.* Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. **Cornea**, v. 30, n. 1, p. 73–82, jan. 2011.

ZHU, W. *et al.* Cell-derived decellularized extracellular matrix scaffolds for articular cartilage repair. **The International journal of artificial organs**, v. 44, n. 4, p. 269–281, abr. 2021a.

_____. Cell-derived decellularized extracellular matrix scaffolds for articular cartilage

repair. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 44, n. 4, p. 269–281, 18 abr. 2021b.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos princípios da engenharia de tecidos, que envolvem a interação entre células, arcabouços e fatores de crescimento, a endodontia regenerativa surgiu como uma alternativa inovadora para o tratamento endodôntico. Seu objetivo é promover a formação de um novo tecido vascularizado dentro dos canais radiculares, restaurando a vitalidade pulpar. Nesse contexto, os arcabouços desempenham um papel fundamental, fornecendo suporte estrutural para a adesão, proliferação e diferenciação celular, favorecendo a regeneração tecidual.

O início da pesquisa de regeneração pulpar foi marcado pela introdução de células-tronco de origem dentária. Desde então, inúmeros estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* têm sido publicados, buscando alternativas mais eficazes e biocompatíveis, com destaque para o desenvolvimento de novos arcabouços. Nesse contexto, tecidos descelularizados têm sido explorados como arcabouços para diversos processos regenerativos, não só odontológicos, uma vez que sua utilização pode ser beneficiada pela manutenção de componentes bioativos do tecido nativo para a regeneração.

Desta forma, protocolos de descelularização da polpa dentária foram desenvolvidos para remover componentes celulares, preservando a integridade de componentes da matriz extracelular original. Proteínas remanescentes deste processo desempenham um papel vital na sinalização celular e na promoção da regeneração tecidual, tornando a matriz descelularizada uma opção promissora como arcabouço em terapias endodônticas regenerativas. A utilização de matrizes descelularizadas da polpa dentária como arcabouço pode oferecer um microambiente favorável para a regeneração do tecido pulpar, potencializando os resultados clínicos e contribuindo para o avanço das terapias endodônticas regenerativas.

Este estudo demonstrou a alta eficácia dos produtos derivados da polpa dentária descelularizada, destacando seu papel crucial na regeneração pulpar. Embora todos os grupos tenham mostrado respostas positivas, os produtos de polpa dentária liofilizada (FDPS e FDPM) se destacaram com resultados superiores, exibindo maior desempenho em comparação com os outros extratos. Esses resultados sugerem que a liofilização pode ser uma abordagem eficaz para preservar as propriedades biológicas da polpa dentária descelularizada, potencializando seus efeitos terapêuticos. O uso desses produtos, tanto na forma liofilizada quanto como

medicação líquida, pode representar uma estratégia promissora para a terapia endodôntica regenerativa.

Esses resultados abrem portas para novos estudos e a possível integração desses produtos na prática clínica. No entanto, para que essa abordagem seja amplamente integrada na prática clínica, novas pesquisas são necessárias para melhorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, como rigidez, viscoelasticidade e biodegradabilidade, bem como para aprimorar os métodos de esterilização, a fim de garantir que os *scaffolds* mantenham suas propriedades biocompatíveis e funcionais ao longo do tempo, assegurando sua viabilidade e sucesso nas aplicações clínicas. Apesar dos avanços, um dos principais desafios está em compreender qual tipo de tecido é realmente formado no local da regeneração, uma vez que não é possível monitorar com precisão esse processo *in vivo*. O tecido resultante pode variar e, embora nem sempre corresponda ao tecido pulpar original, podendo por exemplo apresentar características de um tecido cicatricial, isso não implica necessariamente na falha ou no insucesso clínico da técnica. Desta forma, a busca por um arcabouço que possa guiar a formação deste tecido pulpar especializado se faz necessária para aumentar ainda mais o percentual de sucesso dos processos regenerativos.

Com protocolos eficazes e ajustes adequados nas propriedades dos arcabouços, a descelularização da polpa dentária bovina, suína e humana pode se tornar uma solução viável e acessível para a regeneração pulpar, permitindo a produção de uma quantidade significativa de material e abrindo novas perspectivas para tratamentos menos invasivos e mais eficientes. Assim, os avanços nesta área poderão contribuir significativamente para a evolução da odontologia regenerativa, promovendo abordagens inovadoras para a reparação e a revitalização dos tecidos dentários comprometidos.

6 REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E MATERIAIS E MÉTODOS)

AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. **Biomaterials**, v. 86, p. 68–82, abr. 2016.

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

AFZAL, Z.; HUGUET, E. L. Bioengineering liver tissue by repopulation of decellularised scaffolds. **World journal of hepatology**, v. 15, n. 2, p. 151–179, 27 fev. 2023.

AHMADIAN, E. *et al.* The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 245–254, nov. 2019.

AHMED, E.; SALEH, T.; XU, M. Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, v. 10, n. 7, 15 jul. 2021.

ALAGL, A. *et al.* Use of platelet-rich plasma for regeneration in non-vital immature permanent teeth: Clinical and cone-beam computed tomography evaluation. **Journal of International Medical Research**, v. 45, n. 2, p. 583–593, 23 abr. 2017.

ALGHUTAIMEL, H. *et al.* Investigating the vascularization capacity of a decellularized dental pulp matrix seeded with human dental pulp stem cells: *in vitro* and preliminary *in vivo* evaluations. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 8, p. 1300–1316, 5 ago. 2021.

AL-HAKIM KHALAK, F. *et al.* Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for Tendon Regeneration in Three-Dimensional Bioprinting. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, 26 out. 2022.

ALHOWAISH, N. A. *et al.* Histological Evaluation of Restylane Lyft Used as a Scaffold for Dental Pulp Regeneration in Non-Infected Immature Teeth in Dogs. **Materials**, v. 15, n. 12, p. 4095, 9 jun. 2022.

ALHOWAISH, N. A.; ALSUDANI, D. I.; ALMURAIKHI, N. A. Evaluation of a hyaluronic acid hydrogel (Restylane Lyft) as a scaffold for dental pulp regeneration in a regenerative endodontic organotype model. **Odontology**, v. 110, n. 4, p. 726–734, 26 out. 2022.

ALMEIDA, G. H. D. R. *et al.* Perfusion and Ultrasonication Produce a Decellularized Porcine Whole-Ovary Scaffold with a Preserved Microarchitecture. **Cells**, v. 12, n. 14, 15 jul. 2023.

ALQAHTANI, Q. *et al.* Decellularized Swine Dental Pulp Tissue for Regenerative Root

Canal Therapy. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 13, p. 1460–1467, 1 dez. 2018.

ASHIRY, E. A. EL *et al.* Dental Pulp Revascularization of Necrotic Permanent Teeth with Immature Apices. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 40, n. 5, p. 361–366, 1 jun. 2016.

BAKHTIAR, H. *et al.* Second-generation Platelet Concentrate (Platelet-rich Fibrin) as a Scaffold in Regenerative Endodontics: A Case Series. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 401–408, mar. 2017.

_____. Pulp ECM-derived macroporous scaffolds for stimulation of dental-pulp regeneration process. **Dental Materials**, v. 36, n. 1, p. 76–87, jan. 2020.

_____. Human amniotic membrane extracellular matrix scaffold for dental pulp regeneration *in vitro* and *in vivo*. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 4, p. 374–390, 29 abr. 2022.

BEZGIN, T. *et al.* Efficacy of Platelet-rich Plasma as a Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 36–44, jan. 2015.

BOTERO, T. *et al.* Web-Based Survey on Regenerative Endodontic Practices among Members of the American Association of Endodontists. **Journal of Endodontics**, v. 50, n. 9, p. 1281–1288, set. 2024.

BRIZUELA, C. *et al.* The Four Pillars for Successful Regenerative Therapy in Endodontics: Stem Cells, Biomaterials, Growth Factors, and Their Synergistic Interactions. **Stem Cells International**, v. 2022, p. 1–17, 19 set. 2022.

BROWN, M. *et al.* Decellularized extracellular matrix: New promising and challenging biomaterials for regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 289, p. 121786, out. 2022.

CAEIRO-VILLASENÍN, L. *et al.* Developmental Dental Defects in Permanent Teeth Resulting from Trauma in Primary Dentition: A Systematic Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 2, 10 jan. 2022.

CALLE, E. A. *et al.* Targeted proteomics effectively quantifies differences between native lung and detergent-decellularized lung extracellular matrices. **Acta biomaterialia**, v. 46, p. 91–100, dez. 2016.

CAPELLA-MONSONÍS, H. *et al.* Extracellular matrix-based biomaterials as adipose-derived stem cell delivery vehicles in wound healing: a comparative study between a collagen scaffold and two xenografts. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 510, 27 nov. 2020.

CHEN, G. *et al.* Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. **Biomaterials**, v. 52, p. 56–70, jun. 2015.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 462–84, 2014.

CHOI, J. S. *et al.* In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 1–2, p. 80–92, jan. 2012.

ÇIÇEK, E. *et al.* Effect of Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug Thickness on Fracture Resistance of Immature Teeth. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1697–1700, out. 2017.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011.

CROWLEY, L. C. *et al.* Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 7, 1 jul. 2016.

DAS, T. *et al.* Influence of Calcium in Extracellular DNA Mediated Bacterial Aggregation and Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91935, 20 mar. 2014.

DAYI, B. *et al.* Evaluation of a collagen-bioaggregate composite scaffold in the repair of sheep pulp tissue. **European Oral Research**, v. 0, n. 0, p. 152–161, 25 maio 2021.

DU, L. *et al.* Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. **The British journal of ophthalmology**, v. 95, n. 3, p. 410–4, mar. 2011.

ELNAWAM, H. *et al.* Bovine pulp extracellular matrix hydrogel for regenerative endodontic applications: in vitro characterization and in vivo analysis in a necrotic tooth model. **Head & face medicine**, v. 20, n. 1, p. 61, 22 out. 2024.

FARGES, J.-C. *et al.* Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 230251, 2015.

FREEMAN, F. E. *et al.* Biofabrication of multiscale bone extracellular matrix scaffolds for bone tissue engineering. **European cells & materials**, v. 38, p. 168–187, 11 out. 2019.

FU, J. *et al.* Laminin-Modified Dental Pulp Extracellular Matrix for Dental Pulp Regeneration. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 595096, 2020.

FU, Y. *et al.* Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold. **Cells, tissues, organs**, v. 191, n. 3, p. 193–202, 2010.

GALLER, K. M. *et al.* European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 8, p. 717–723, 23 ago. 2016.

GIBBISON, R.; CROZIER, R. Does primary trauma lead to developmental defects in permanent teeth? **Evidence-based dentistry**, v. 23, n. 3, p. 112–113, set. 2022.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

GILPIN, S. E. *et al.* Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 33, n. 3, p. 298–308, mar. 2014.

GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GONÇALVES DA COSTA SOUSA, M. *et al.* Antibiofilm and immunomodulatory resorbable nanofibrous filing for dental pulp regenerative procedures. **Bioactive Materials**, v. 16, p. 173–186, out. 2022.

GRANZ, C. L.; GORJI, A. Dental stem cells: The role of biomaterials and scaffolds in developing novel therapeutic strategies. **World journal of stem cells**, v. 12, n. 9, p. 897–921, 26 set. 2020.

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625–30, 5 dez. 2000.

GU, B. K. *et al.* 3D Bioprinting Technologies for Tissue Engineering Applications. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1078, p. 15–28, 2018.

GUNGOR-OZKERIM, P. S. *et al.* Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials science**, v. 6, n. 5, p. 915–946, 1 maio 2018.

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C.; DHASMANA, A. Erratum to: Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1577, p. 337, 2018.

HASEGAWA, M. *et al.* Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. **Tissue engineering**, v. 11, n. 3–4, p. 469–78, [s.d.].

HAUGEN, H. J. *et al.* Injectable Biomaterials for Dental Tissue Regeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, 13 maio 2020.

HE, L. *et al.* Regenerative Endodontics by Cell Homing. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 1, p. 143–159, jan. 2017.

HODDE, J. *et al.* Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 4, p. 537–43, abr. 2007.

HU, L. *et al.* Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017a.

_____. Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017b.

HUANG, Q. *et al.* Use of peracetic acid to sterilize human donor skin for production of acellular dermal matrices for clinical use. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 12, n. 3, p. 276–87, 2004.

HUANG, Z.; GODKIN, O.; SCHULZE-TANZIL, G. The Challenge in Using Mesenchymal Stromal Cells for Recellularization of Decellularized Cartilage. **Stem cell reviews and reports**, v. 13, n. 1, p. 50–67, fev. 2017.

IESO, M. L. DE; PEI, J. V. An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. **Bioscience reports**, v. 38, n. 5, 31 out. 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva, Switzerland: [s.n.].

INUYAMA, Y. *et al.* Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 92B, n. 1, p. 120–128, 2 jan. 2010.

ISHIMATSU, H. *et al.* Formation of Dentinal Bridge on Surface of Regenerated Dental Pulp in Dentin Defects by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor–2 From Gelatin Hydrogels. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 6, p. 858–865, jun. 2009.

JABLONSKÁ, E. *et al.* Test conditions can significantly affect the results of in vitro cytotoxicity testing of degradable metallic biomaterials. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 6628, 23 mar. 2021.

JIANG, L. *et al.* The Expression and Role of Stromal Cell–derived Factor-1 α –CXCR4 Axis in Human Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 939–944, ago. 2008.

JIANG, Y. *et al.* Extracellular matrix grafts: From preparation to application (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 47, n. 2, p. 463–474, fev. 2021.

KANNO, K. *et al.* Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4-interleukin-1R

signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 312, 21 out. 2020.

KARAMANOS, N. K. *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS journal**, v. 288, n. 24, p. 6850–6912, dez. 2021.

KARAMIFAR, K.; TONDARI, A.; SAGHIRI, M. A. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. **European endodontic journal**, v. 5, n. 2, p. 54–67, 2020.

KASRAVI, M. *et al.* Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials research**, v. 27, n. 1, p. 10, 9 fev. 2023a.

_____. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials research**, v. 27, n. 1, p. 10, 9 fev. 2023b.

KAVITHA, M. *et al.* Comparative Evaluation of Platelet-rich Fibrin and Concentrated Growth Factor as Scaffolds in Regenerative Endodontic Procedure: A Randomized Controlled Clinical Trial. **The journal of contemporary dental practice**, v. 23, n. 12, p. 1211–1217, 1 dez. 2022.

KHORASANI, M. M. Y. *et al.* Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. **Cytokine**, v. 126, p. 154896, fev. 2020.

KHURSHID, Z. *et al.* Future of Decellularized Dental Pulp Matrix in Regenerative Endodontics. **European journal of dentistry**, v. 16, n. 4, p. 737–741, out. 2022a.

_____. Future of Decellularized Dental Pulp Matrix in Regenerative Endodontics. **European Journal of Dentistry**, v. 16, n. 04, p. 737–741, 6 out. 2022b.

KIKUCHI, N. *et al.* Formation of Dentin-like Particles in Dentin Defects above Exposed Pulp by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor 2 from Gelatin Hydrogels. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 10, p. 1198–1202, out. 2007.

KIM, B. S. *et al.* Decellularized extracellular matrix: a step towards the next generation source for bioink manufacturing. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 034104, 4 ago. 2017.

KIM, J. Y. *et al.* Regeneration of Dental-Pulp-like Tissue by Chemotaxis-Induced Cell Homing. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 10, p. 3023–3031, out. 2010.

KIM, S. G. *et al.* Regenerative endodontics: a comprehensive review. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 12, p. 1367–1388, 11 dez. 2018.

KOEHBACH, J. *et al.* MALDI TOF/TOF-Based Approach for the Identification of d-Amino Acids in Biologically Active Peptides and Proteins. **Journal of proteome research**, v.

15, n. 5, p. 1487–96, 6 maio 2016.

KOKKAS, A. *et al.* The role of cytokines in pulp inflammation. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 25, n. 3, p. 303–11, 2011.

KWON, Y. S. *et al.* Behaviour of human dental pulp cells cultured in a collagen hydrogel scaffold cross-linked with cinnamaldehyde. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 1, p. 58–66, 6 jan. 2017.

LEE, D. J. *et al.* Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. **Journal of tissue engineering**, v. 7, p. 2041731416680306, 2016.

_____. Decellularized pulp matrix as scaffold for mesenchymal stem cell mediated bone regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 11, p. 204173142098167, 17 jan. 2020.

LI, L. *et al.* Decellularized extracellular matrix loaded with IPFP-SC for repairing rabbit osteochondral defects. **American journal of translational research**, v. 13, n. 10, p. 11026–11047, 2021.

LI, T.; JAVED, R.; AO, Q. Xenogeneic Decellularized Extracellular Matrix-based Biomaterials For Peripheral Nerve Repair and Regeneration. **Current neuropharmacology**, v. 19, n. 12, p. 2152–2163, 2021.

LIANG, C.; LIAO, L.; TIAN, W. Advances Focusing on the Application of Decellularized Extracellular Matrix in Periodontal Regeneration. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, 14 abr. 2023.

LIU, C. *et al.* Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56–82, fev. 2022a.

_____. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56–82, fev. 2022b.

LIU, X. *et al.* Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve. **Xenotransplantation**, v. 25, n. 2, 15 mar. 2018.

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**, v. 4, n. 4, p. 808–16, jul. 2008.

MACRIN, D. *et al.* Metabolism as an early predictor of DPSCs aging. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2195, 18 dez. 2019.

MARTIN-PIEDRA, M. A. *et al.* Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 266–277, fev. 2014.

MATAI, I. *et al.* Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative

engineering. **Biomaterials**, v. 226, p. 119536, jan. 2020.

MATICHESCU, A. *et al.* Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration—A Review. **Materials**, v. 13, n. 22, p. 5303, 23 nov. 2020.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 6, p. 663–673, jun. 2018.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 6, p. 663–673, 16 jun. 2018.

MATOUG-ELWERFELLI, M. *et al.* Ex-vivo recellularisation and stem cell differentiation of a decellularised rat dental pulp matrix. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 21553, 2020a.

_____. Ex-vivo recellularisation and stem cell differentiation of a decellularised rat dental pulp matrix. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21553, 9 dez. 2020b.

MATTEI, V. *et al.* Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect? **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 5, p. 1635–1646, 7 out. 2021.

MCINNES, A. D.; MOSER, M. A. J.; CHEN, X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. **Journal of functional biomaterials**, v. 13, n. 4, 14 nov. 2022a.

_____. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. **Journal of functional biomaterials**, v. 13, n. 4, 14 nov. 2022b.

MEHBOOB, R. *et al.* Enhanced Neurokinin-1 Receptor Expression Is Associated with Human Dental Pulp Inflammation and Pain Severity. **BioMed research international**, v. 2021, p. 5593520, 2021.

MINIC, S. *et al.* Tissue Characteristics in Endodontic Regeneration: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10534, 11 set. 2022.

MITSIADIS, T. A.; MAGLOIRE, H.; PAGELLA, P. Nerve growth factor signalling in pathology and regeneration of human teeth. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1327, 2 dez. 2017.

MIURA, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807–12, 13 maio 2003.

MOHITE, P. *et al.* Comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine apical plug thickness on fracture resistance of immature teeth: An In vitro study. **Annals of**

African medicine, v. 21, n. 3, p. 198–203, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOUSSA, D. G.; APARICIO, C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. term.2769, 17 dez. 2018.

MOUSSA, D. G.; APARICIO, C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 13, n. 1, p. 58–75, jan. 2019.

MUNCIE, J. M.; WEAVER, V. M. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. **Current topics in developmental biology**, v. 130, p. 1–37, 2018.

MUÑOZ-CARRILLO, J. L. *et al.* The Role of microRNAs in Pulp Inflammation. **Cells**, v. 10, n. 8, 2021.

MURRAY, P. E. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 11 out. 2018.

_____. Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. S2, p. 188–199, 15 mar. 2023.

MURRAY, P. E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K. M. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 4, p. 377–390, abr. 2007.

NAKASHIMA, M.; IOHARA, K. Regeneration of Dental Pulp by Stem Cells. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 313–319, 15 jul. 2011.

NEVE, A. *et al.* Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. **BioMed research international**, v. 2014, p. 756078, 2014.

NICOLOSO, G. F. *et al.* A comparative evaluation of endodontic treatments for immature necrotic permanent teeth based on clinical and radiographic outcomes: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, n. 3, p. 217–227, 16 maio 2017.

_____. Pulp Revascularization or Apexification for the Treatment of Immature Necrotic

Permanent Teeth: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 43, n. 5, p. 305–313, 1 jan. 2019.

OHATA, K.; OTT, H. C. Human-scale lung regeneration based on decellularized matrix scaffolds as a biologic platform. **Surgery today**, v. 50, n. 7, p. 633–643, jul. 2020.

OMIDI, S. *et al.* The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 23, n. 6, p. 768–775, jun. 2020.

PANJWANI, P. *et al.* The effect of varying thicknesses of mineral trioxide aggregate (MTA) and Biodentine as apical plugs on the fracture resistance of teeth with simulated open apices: a comparative in vitro study. **PeerJ**, v. 12, p. e18691, 2024.

PARK, W.; GAO, G.; CHO, D.-W. Tissue-Specific Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for Musculoskeletal Tissue Regeneration and Modeling Using 3D Bioprinting Technology. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, 22 jul. 2021.

PATI, F. *et al.* Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature communications**, v. 5, p. 3935, 2 jun. 2014a.

_____. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature communications**, v. 5, p. 3935, 2 jun. 2014b.

PIGEOT, S. *et al.* Orthotopic Bone Formation by Streamlined Engineering and Devitalization of Human Hypertrophic Cartilage. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, 30 set. 2020.

POPOV, L.-D. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892–4899, maio 2020.

RAMM, R. *et al.* Decellularization combined with enzymatic removal of N-linked glycans and residual DNA reduces inflammatory response and improves performance of porcine xenogeneic pulmonary heart valves in an ovine in vivo model. **Xenotransplantation**, v. 27, n. 2, 26 mar. 2020.

RAVINDRAN, S.; HUANG, C.-C.; GEORGE, A. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2014a.

_____. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2014b.

RECHENBERG, D.-K.; GALICIA, J. C.; PETERS, O. A. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0167289, 2016a.

_____. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. **PloS one**, v.

11, n. 11, p. e0167289, 2016b.

RIBEIRO, V. M. DOS S. *et al.* Histologic and proteomic profile of two methods to decellularize human dental pulp tissue. **Archives of Oral Biology**, v. 157, p. 105847, jan. 2024.

RODERJAN, J. G. *et al.* Structural assessments in decellularized extracellular matrix of porcine semilunar heart valves: Evaluation of cell niches. **Xenotransplantation**, v. 26, n. 3, p. e12503, maio 2019.

ROSARIO, D. J. *et al.* Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. **Regenerative medicine**, v. 3, n. 2, p. 145–56, mar. 2008.

ROWLEY, A. T. *et al.* Extracellular Matrix-Based Strategies for Immunomodulatory Biomaterials Engineering. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 8, p. e1801578, abr. 2019.

SALDIN, L. T. *et al.* Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 1–15, fev. 2017.

SANTIS, M. M. DE *et al.* Extracellular-Matrix-Reinforced Bioinks for 3D Bioprinting Human Tissue. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 33, n. 3, p. e2005476, jan. 2021.

SASSI, L. *et al.* A Perfusion Bioreactor for Longitudinal Monitoring of Bioengineered Liver Constructs. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, 21 jan. 2021.

SEIF-NARAGHI, S. B. *et al.* Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. **Science translational medicine**, v. 5, n. 173, p. 173ra25, 20 fev. 2013.

SINGELYN, J. M. *et al.* Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 8, p. 751–63, 21 fev. 2012.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 397–419, 10 nov. 2010.

SOARES, D. G. *et al.* Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 9, p. 2827–2839, 9 dez. 2017.

SONG, J. S. *et al.* Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 6, p. 640–646, 14 jun. 2017.

SONOYAMA, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PloS one**, v. 1, p. e79, 20 dez. 2006.

TAO, M. *et al.* Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 9, p. 2927–2945, set. 2021.

TATULLO, M. *et al.* Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1205–1216, nov. 2015.

TCHOUKALOVA, Y. D. *et al.* Tracheal decellularization using a combination of chemical, physical and bioreactor methods. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 2, p. 100–107, 28 fev. 2018.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4–27, 1 fev. 2016.

TIEMANN, T. T. *et al.* Towards uterus tissue engineering: a comparative study of sheep uterus decellularisation. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 167–178, 26 mar. 2020.

TONG, H. J. *et al.* Deep dentine caries management of immature permanent posterior teeth with vital pulp: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 124, p. 104214, set. 2022.

TRAPHAGEN, S. B. *et al.* Characterization of natural, decellularized and reseeded porcine tooth bud matrices. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p. 5287–96, jul. 2012.

UZARSKI, J. S. *et al.* Sustained in vivo perfusion of a re-endothelialized tissue engineered kidney graft in a human-scale animal model. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 11, p. 1184408, 2023.

VASEENON, S. The Observation of Inflammation, Oxidative Stress, Mitochondrial Dynamics, and Apoptosis in Dental Pulp following a Diagnosis of Irreversible Pulpitis. **European Endodontic Journal**, 2022.

WACHS, R. A. *et al.* Apoptosis-Decellularized Peripheral Nerve Scaffold Allows Regeneration across Nerve Gap. **Cells Tissues Organs**, p. 1–11, 26 ago. 2022.

WANG, X. *et al.* Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 4, p. 1017–1025, 4 abr. 2014.

WANG, Y. *et al.* Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. **Xenotransplantation**,

v. 22, n. 1, p. 48–61, 7 jan. 2015.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Signaling in control of cell growth and metabolism. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 7, p. a006783, 1 jul. 2012.

WASSENAAR, J. W. *et al.* Evidence for Mechanisms Underlying the Functional Benefits of a Myocardial Matrix Hydrogel for Post-MI Treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 9, p. 1074–1086, 8 mar. 2016.

WHITE, L. J. *et al.* The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta biomaterialia**, v. 50, p. 207–219, 1 mar. 2017.

WIGLER, R. *et al.* Revascularization: A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 319–326, mar. 2013.

YANG, J.; DANG, H.; XU, Y. Recent advancement of decellularization extracellular matrix for tissue engineering and biomedical application. **Artificial Organs**, v. 46, n. 4, p. 549–567, abr. 2022.

YANG, Y. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo. **Acta biomaterialia**, v. 69, p. 71–82, 15 mar. 2018.

YAO, Q. *et al.* Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 104, p. 109942, nov. 2019.

YU, C.; ABBOTT, P. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Australian Dental Journal**, v. 52, n. s1, 12 mar. 2007.

YUE, W. *et al.* Differential Protein Expression in Human Dental Pulp: Comparison of Healthy, Inflamed, and Traumatic Pulp. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 8, 16 ago. 2019.

ZAKY, S. H. *et al.* The role of inflammation modulation in dental pulp regeneration. **European cells & materials**, v. 41, p. 184–193, 14 fev. 2021.

ZANARDO, T. É. C. *et al.* Decellularized Splenic Matrix as a Scaffold for Spleen Bioengineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 573461, 2020.

ZANINI, M.; MEYER, E.; SIMON, S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 7, p. 1033–1051, jul. 2017a.

_____. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 7, p. 1033–1051, jul. 2017b.

ZHAN, C. *et al.* Dental nerves: a neglected mediator of pulpitis. **International**

Endodontic Journal, v. 54, n. 1, p. 85–99, 26 jan. 2021.

ZHANG, J. *et al.* 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, 12 abr. 2021.

ZHANG, W. *et al.* Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 5, p. 516–523, 24 maio 2017.

ZHANG, X. *et al.* Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. **Bioactive materials**, v. 10, p. 15–31, abr. 2022.

ZHE, M. *et al.* Recent Advances in Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 8, 18 abr. 2023.

ZHOU, Y. *et al.* Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. **Cornea**, v. 30, n. 1, p. 73–82, jan. 2011.

ZHU, W. *et al.* Cell-derived decellularized extracellular matrix scaffolds for articular cartilage repair. **The International journal of artificial organs**, v. 44, n. 4, p. 269–281, abr. 2021a.

_____. Cell-derived decellularized extracellular matrix scaffolds for articular cartilage repair. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 44, n. 4, p. 269–281, 18 abr. 2021b.

7 ANEXOS

ANEXO 1: Parecer consubstanciado de aprovação do projeto no CEP/UCB:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial regenerativo in vitro de polpas descelularizadas como scaffold biológico

Pesquisador: Taia Maria Berto Rezende

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64960022.7.0000.0029

Instituição Proponente: Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Patrocinador Principal: Universidade Católica de Brasília - UCB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.806.133

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do programa Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Instituição Universidade Católica de Brasília a ser desenvolvido pela estudante de mestrado Autora: Mayara Alves de Oliveira sob orientação da professora Taia Maria Berto Rezende.

RESUMO:

Terapias endodônticas regenerativas vêm sendo apontadas recentemente como promissoras, principalmente para dentes permanentes imaturos, uma vez que assegura um prognóstico mais favorável com maior longevidade ao paciente. Embora o tecido pulpar alcançado não seja idêntico ao nativo, a revascularização pulpar permite a continuidade do processo da formação radicular dentária. Para sucesso na terapia endodôntica regenerativa são necessários: arcabouço, células-tronco indiferenciadas e fatores de crescimento. Este estudo objetiva avaliar o potencial da matriz pulpar descelularizada como arcabouço biológico para o processo de regeneração tecidual. Diante disso, protocolos de descelularização serão testados e avaliados quanto a eficiência da descelularização por meio de análise histológica, subsequente a recelularização desta matriz descelularizada por células-tronco da polpa será realizada. Nesse contexto, culturas primárias de células extraídas de dentes permanentes hígidos serão cultivadas em meio de cultura e incubados a 37 °C. Em sequência, as células pulpares serão semeadas sobre as matrizes descelularizadas da

Endereço: QS 07 Lote 01 EPCT - Bloco R, Sala 201
Bairro: Taguatinga **CEP:** 71.966-700
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)33563-9784 **Fax:** (61)33563-9636 **E-mail:** cep@ucb.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 10 de Dezembro de 2022

Assinado por:**MARCELO HENRIQUE SOLLER RAMADA**
(Coordenador(a))**Endereço:** QS 07 Lote 01 EPCT - Bloco R, Sala 201**Bairro:** Taguatinga**CEP:** 71.966-700**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)33563-9784**Fax:** (61)33563-9636**E-mail:** cep@ucb.br

ANEXO 2: Trabalho como autora em fase de resposta aos revisores na *Brazilian Journal of Oral Sciences* (Qualis A3)

IMMUNONEUROGENIC PULP TISSUE RESPONSE: A REVIEW OF THE MOLECULAR AND CELULAR MECHANISMS RELATED TO PULP TISSUE REGENERATION

Mayara Alves de Oliveira¹, Maurício Gonçalves da Costa Sousa^{2,3,4}, Taia Maria Berto Rezende^{1,5,6}

¹Post-graduation in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Darcy Ribeiro Campus s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

²Division of Biomaterials and Biomechanics, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Oregon Health & Science University, Portland OR, United States

³Knigh Cancer Precision Biofabrication Hub, Knigh Cancer Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR, United States

⁴Cancer Early Detection Advanced Research Center, Oregon Health Science University, Portland, OR, United States

⁵Dentistry Department, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

⁶Post-graduation in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Taguatinga Sul – Taguatinga, Brasília – DF, 71966-700, Brazil

⁶Dentistry Department, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

Correspondence:

Taia Maria Berto Rezende

Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia
Faculdade de Ciências da Saúde Campos Univ. Darcy Ribeiro s/n Universidade de Brasília – Asa Norte - Brasília – DF, Brazil

Fone: + 55-61-981349001

e-mail: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br

ACKNOWLEDGMENTS:

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305242/2022-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (200085891), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (00193-0000782/2021-63 and 00193-00001118/2021-31).]

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

ANEXO 3: Trabalho como colaboradora aceito para publicação durante período de Mestrado na Revista *Journal of Endodontics* (Qualis A1)

ARTICLE IN PRESS	
BASIC RESEARCH – BIOLOGY	
Senescence on Dental Pulp Cells: Effects on Morphology, Migration, Proliferation, and Immune Response	57
Jade Ormondes de Farias,*	58
Maurício Gonçalves da Costa Sousa, ^{†‡§}	59
Danielo César Mota Martins,*	60
Mayara Alves de Oliveira,*	61
Isadora Takahashi,*	62
Larissa Barbosa de Sousa,*	63
Ingrid Gracielle Martins da Silva, [¶]	64
José Raimundo Corrêa, [¶]	65
Amanda Evelin Silva Carvalho, [¶]	66
Felipe Saldanha Araújo, [¶] and	67
Taís Maria Berto Rezende, PhD, ^{**}	68
MD, DDS ^{†§***††}	69
	70
	71
	72
	73
	74
	75
SIGNIFICANCE	76
This study reveals that senescence in dental pulp cells causes morphological alterations, reduced cell function, and an exacerbated inflammatory and immunosuppressive response, potentially complicating conservative endodontic prognosis. Managing senescence is crucial for better treatment outcomes in endodontics.	77
	78
	79
	80
	81
	82
	83
	84
	85
	86
	87
	88
	89
	90
	91
	92
	93
	94
	95
From the *Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil;	96
†Division of Biomaterials and Biomechanics, Department of Restorative, Dentistry, School of Dentistry, Oregon Health & Science University, Portland Oregon; ‡Knigh Cancer Precision Biotechnology Hub, Knigh Cancer Institute, Oregon, Health and Science University, Portland, Oregon;	100
§Cancer Early Detection Advanced Research Center, Oregon Health Science University, Portland, Oregon; ¶Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ¶Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; **Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ***Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, and ††Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil	101
	102
	103
	104
	105
	106
	107
	108
	109
	110
	111
	112
	113
	114
	115
	116
	117
	118
ABSTRACT	
Introduction: Evidence indicates that senescence can affect essential dental pulp functions, such as defense capacity and repair, consequently affecting the successes of conservative endodontic treatments. This study aims to evaluate the effects of senescence on the morphology, migration, proliferation, and immune response of human dental pulp cells.	
Methods: Cells were treated with doxorubicin to induce senescence, confirmed by β -galactosidase staining. Morphological changes, cellular proliferation, and migration were evaluated by scanning electron microscopy, trypan blue cells, and the scratch method, respectively. Modifications in the immune response were evaluated by measuring the genes for pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin (IL) 6 and anti-inflammatory cytokines transforming growth factor beta 1 and IL 10 using the PCR assay.	
Results: An increase in cell size and a decrease in the number of extensions were observed in senescent cells. A reduction in the proliferative and migratory capacity was also found in senescent cells. In addition, there was an increase in the gene expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and IL-6 and a decrease in the gene expression of IL-10 and transforming growth factor beta 1, suggesting an exacerbated inflammatory situation associated with immunosuppression. Conclusions: Cellular senescence is possibly a condition that affects prognoses of conservative endodontic treatments, as it affects primordial cellular functions related to this treatment. (<i>J Endod</i> 2024; ■:1–8.)	
KEY WORDS	
Conservative endodontic treatments; pulp cells; senescence	
Senescence is a cellular state characterized by the irreversible interruption of the cell cycle halting replication in the G1 phase and remaining alive and metabolically active ¹ . This state can be divided into replicative senescence, related to telomere shortening, and stress-induced senescence. Cellular senescence causes morphological alterations such as increased volume and irregular structure, and it is associated with changes in the cytoskeleton and vimentin filaments ¹ . Senescent cells also exhibit increased activity of lysosomes and enzyme SA- β -gal, as well as upregulated expression of genes such as p21, p16, and p53 ² . This cellular state also results in metabolic reprogramming and the manifestation of secretory proteins, known as the senescence-associated secretory phenotype ³ . In general, this state contributes to aging, age-related diseases, and a decline in cellular functions ⁴ .	
Senescence can also affect the immune system ⁵ . Immunosenescence refers to changes in the immune system during aging, leading to a progressive decline in immune functions and increased susceptibility to diseases ⁶ . This stage results from two complementary processes: the effects of cellular senescence on immune cells and the weakening of the body's barriers indirectly caused by tissue cellular senescence, which promotes the release of signaling molecules to which immune cells respond ⁷ . Senescence-associated secretory phenotype proteins compromise immune system functions, including the elimination of senescent cells, and induce senescence in neighboring cells through paracrine signaling ⁸ . In addition, aging is also accompanied by a state of inflammation known as inflammaging, which is characterized by chronic, low-grade, and sterile inflammation ⁹ .	

ANEXO 4: Trabalhos como colaboradora em fase de submissão na Revista *International Endodontic Journal* (Qualis A1)

**Antimicrobial, Toxicity, and Cellular Interactions of Bioceramic Sealers in
Periodontal Ligament: *In Vitro* Insights**

Raquel Figuerêdo Ramos¹, Johnny Carvalho da Silva¹, Maria Ester França de Melo¹, Larissa Barbosa de Sousa¹, Mayara Alves de Oliveira¹, Elizabete Cristina Iseke Bispo², Rosiane Andrade Costa³, Danilo César Mota Martins⁴, Amandda Evelin Silva Carvalho⁵, Eliete Neves da Silva Guerra^{1,6}, Felipe Saldanha-Araújo², Taia Maria Berto Rezende^{1,3,6,7}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ² Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ³ Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁴ Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁵ Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁶ Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ⁷ Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Running title: BIOCERAMIC SEALERS AND PERIODONTAL LIGAMENT CELLS.

Keywords: Antimicrobial, bioceramics, biocompatibility, toxicity, bioactivity.

Corresponding author data:

Taia M. B. Rezende, Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte- Brasília

Zip code: 70.910-900, DF- Brazil.

E-mail: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br

MTA REPAIR HP AND BIO C REPAIR: ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC, MIGRATION AND CYTOKINE EXPRESSION

Running title: ACTIVITY OF REPAIR BIOCERAMICS

Larissa Barbosa de Sousa¹, Chrislaine Caroliny Dias², Mayara Alves de Oliveira¹, Raquel Figuerêdo Ramos¹, Elizabete Cristina Iseke Bispo³, Johnny Carvalho da Silva¹, Rosiane Andrade Costa⁵, Felipe Saldanha Araújo³, Taia Maria Berto Rezende^{1,4,5,6}.

¹Postgraduation in Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

²Graduation in Dentistry, Catholic University of Brasília, QS 07, lot 01, Bloco S, Taguatinga Sul, Brasília - DF, 71966-700, Brazil.

³Postgraduation Program in Pathology Molecular, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil.

⁴Dentistry Department, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

⁵Postgraduation in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, QS 07, lot 01, Bloco-G, room G106.A, Taguatinga Sul – Taguatinga, Brasília – DF, 71966-700, Brazil.

⁶Postgraduation in Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro s/n-Asa Norte, Brasília, DF, Brazil.

*Corresponding author data:

Taia M. B. Rezende, Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Campus Univ. Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte- Brasília

Zip code: 70.910-900, DF- Brazil.

Phone : +55 61 981349001

E-mail: taiambr@gmail.com

Secondary e-mail: taia.rezende@unb.br