

PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS GENGIVAIS PARA O TRATAMENTO DE LESÕES PERIODONTAIS

Autora: Bárbara de Oliveira Horvath Pereira

Coautores: Leandro Norberto da Silva Júnior; Bianca de Oliveira Horvath Pereira

Orientadora: Maria Angelica Miglino

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

bhorvath172@gmail.com

Objetivos

Produzir um *scaffold* acelular e estruturado de palato bovino para implante em lesões periodontais. Os objetivos específicos desta proposta se dividem em: Promover a descelularização de gengivas suínas e bovinas; Realizar o estudo comparativo de descelularização com diferentes concentrações de SDS; Avaliar os protocolos de descelularização quando a sua eficácia em produzir um *scaffold* acelular e estruturado; Realizar o cultivo de células nos *scaffolds* para avaliar sua capacidade de fornecer um ambiente propício para a adesão e o desenvolvimento celular.

Métodos e Procedimentos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP CEUAX N 2277300322.

As amostras de palatos bovinos (10 peças) foram coletadas em abatedouro na cidade de Anápolis-Goiás (Figura 1). Após coletadas as amostras foram congeladas e transportadas para o laboratório de terapia celular e células-tronco da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. As amostras ficaram armazenadas no freezer -80°C até o momento da descelularização.



Figura 1. Palato bovino após a coleta em abatedouro

Foi realizada a descelularização por agitação com o biomaterial em imersão nos detergentes celulares. O comparativo de descelularização foi realizado em fragmentos de aproximadamente 3 cm² (Figura 2) em soluções contendo 0.1%, 0.5% e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (SigmaAldrich) por 7 dias (NADERI et al., 2013). Ao final dos protocolos de descelularização os *scaffolds* foram fragmentados e fixados de acordo com cada análise a ser realizada, bem como o controle que foi fragmentado e fixado após a coleta. As análises propostas são: Quantificação de DNA genômico, Testes Histológicos pelas colorações de Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson, Picro Sirius Red, Alcian Blue, Fucsina; Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, Fluorescência de núcleos por coloração com DAPI e Teste de sobrevivência celular nos *scaffolds*.

Resultados

Após a descelularização foi observado que macroscopicamente os fragmentos estavam

esbranquiçados (Figura 2B) quando comparadas com as amostras de palato bovino controle (Figura 2A).

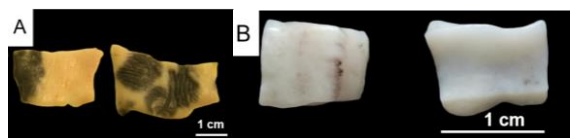


Figura 2: Em A fragmentos de palato bovino antes da descelularização. Em B, fragmentos após a descelularização por agitação em imersão.

Os resultados parciais apontam que ao utilizar SDS 0,1%, os *scaffolds* apresentaram núcleos celulares, somado a danos estruturais na matriz extracelular (MEC) como é possível observar nas colorações de Picro Sirius Red (Figura 3B e 3F), Alcian Blue (Figura 3J), Fucsina (Figura 3N) e Fluorescência por DAPI (Figura 3R). No protocolo com SDS 0,5%, a descelularização foi efetiva e tanto a MEC quanto os componentes elásticos foram preservados (Figura 3C, 3G, 3K, 3O e 3S), sendo assim, este foi definido como o protocolo a ser utilizado nesse experimento, uma vez que a descelularização dos palatos bovinos ocorreu sem degradação da MEC e com a completa remoção do conteúdo celular, não apresentando impedimentos mecânicos para a recelularização, pois, tanto para essa etapa quanto para um futuro implante é crucial que a matriz esteja bem preservada, apresentando quantidade mínima de DNA residual, para que as novas células consigam aderir, bem como, evitar processos imunogênicos (CRAPO et al., 2012; BADYLAK et al., 2013). Na concentração de SDS 1% os *scaffolds* não apresentaram núcleos celulares, porém, a matriz extracelular e as fibras colágenas foram degradadas, não se mostrando um protocolo eficiente para a descelularização (Figura 3D, 3H, 3L, 3P e 3T).

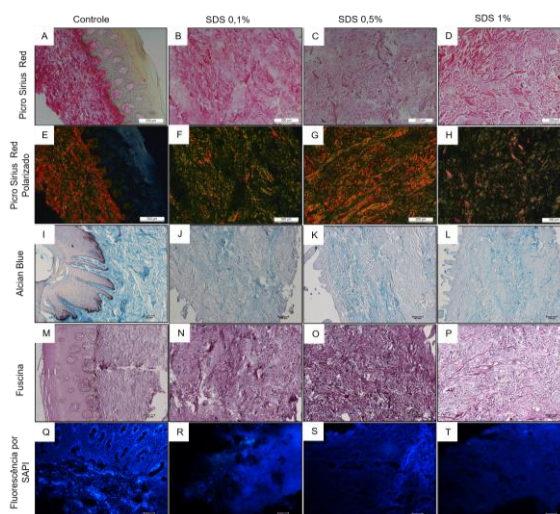


Figura 3: Avaliação histológica das amostras (A-P). As imagens de fluorescência por DAPI evidenciam os núcleos permeados na matriz (Q-T)

Conclusões

Os resultados preliminares obtidos apontam que palatos bovinos podem ser descelularizados e transformados em *scaffolds* biológicos para tentativa de tratamento de lesões periodontais. Desta forma, ainda são necessárias análises morfológicas e de interação celular para o desenvolvimento de um protótipo de implante de *scaffold* biológico.

Referências Bibliográficas

- BADYLAK, S. F., TAYLOR, D., & UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Annual review of biomedical engineering**, 13, 27-53, 2011.
- CRAPO, P. M., et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. **Biomaterials**, 33(13), 3539-3547, 2012.
- NADERI, S., et al. Three-dimensional scaffold from decellularized human gingiva for cell cultures: glycoconjugates and cell behavior. **Cell Journal (Yakhteh)**, 15(2), 166, 2013.

PRODUCTION OF GINGIVAL SCAFFOLDS FOR THE TREATMENT OF PERIODONTAL INJURIES

Author: Bárbara de Oliveira Horvath Pereira

Coauthors: Leandro Norberto da Silva Júnior; Bianca de Oliveira Horvath Pereira

Supervisor: Maria Angelica Miglino

**UNIVERSITY OF SÃO PAULO
School of Veterinary Medicine and Animal Science**

bhorvath172@gmail.com

Objectives

To produce an acellular and structured bovine palate scaffold for implantation in periodontal lesions. The specific objectives of this proposal are divided into: Promoting the decellularization of bovine palate; Realizing the comparative study of decellularization with different concentrations of SDS; Evaluating decellularization protocols for their effectiveness in producing an acellular and structured scaffold; Cultivating cells on the scaffolds to assess their ability to provide an environment conducive to cell adhesion and development.

Methods and Procedures

The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science at USP CEUAX N 2277300322.

Samples of bovine palates (10 pieces) were collected at a slaughterhouse in the city of Anápolis - Goiás (Figure 1). After collection, the samples were frozen and transported to the cell therapy and stem cell laboratory of the School of Veterinary Medicine and Animal Science at USP. The samples were stored in a freezer at -80°C until the time of decellularization.



Figure 1. Bovine palate after collection at a slaughterhouse

Decellularization was performed by agitation with the biomaterial immersed in cellular detergents. The decellularization comparison was performed with fragments of approximately 3 cm² (Figure 2) in solutions containing 0.1%, 0.5% and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (SigmaAldrich) for 7 days (NADERI et al., 2013). At the end of the decellularization protocols, the scaffolds were fragmented and fixed according to each analysis to be performed, as well as the control group that was fragmented and fixed after collection. The proposed analyzes were: Quantification of genomic DNA, Histological Tests by Hematoxylin and Eosin stains, Masson's Trichrome, Picro Sirius Red, Alcian Blue, Fuchsin; Scanning Electron Microscopy Technique, Fluorescence of nuclei by DAPI staining and Cell survival test in scaffolds.

Results

After decellularization, it was observed that macroscopically the fragments were whitish

(Figure 2B) when compared to the control bovine palate samples (Figure 2A).

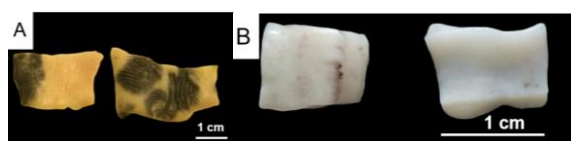


Figure 2: In A, bovine palate fragments before decellularization. In B, fragments after decellularization by immersion agitation.

The partial results indicate that when using 0.1% SDS, the scaffolds showed cellular nuclei, in addition to structural damage to the extracellular matrix (ECM) as it is possible to observe in Picro Sirius Red (Figure 3B and 3F), Alcian Blue (Figure 3J), Fuchsin (Figure 3N) and Fluorescence by DAPI (Figure 3R) stains. In the protocol with SDS 0.5%, decellularization was effective and both the ECM and the elastic components were preserved (Figure 3C, 3G, 3K, 3O and 3S), therefore, this was defined as the protocol to be used in this experiment, since the decellularization of the bovine palates occurred without degradation of the ECM and with the complete removal of the cellular content, presenting no mechanical impediments to the recellularization, because, both for this stage and for a future implant, it is crucial that the matrix is well preserved, presenting a minimal amount of residual DNA, so that new cells can adhere, as well as avoid immunogenic processes (CRAPO et al., 2012; BADYLAK et al., 2013). At 1% SDS concentration, the scaffolds did not present cellular nuclei, however, the extracellular matrix and collagen fibers were degraded, not being an efficient protocol for decellularization (Figure 3D, 3H, 3L, 3P and 3T).

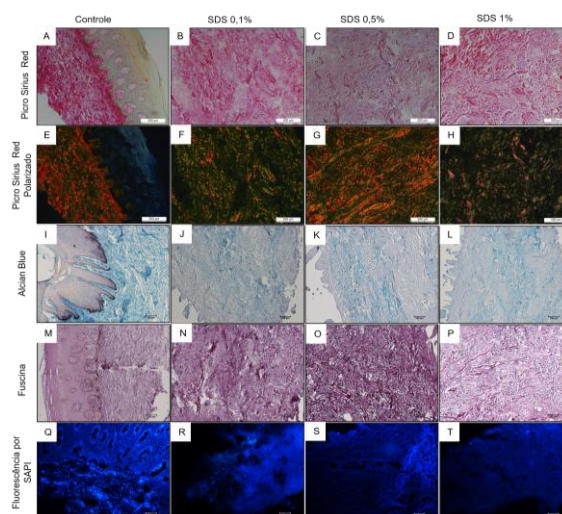


Figure 3: Histological evaluation of samples (A-P). DAPI fluorescence images show the nuclei permeated in the matrix (Q-T)

Conclusions

The preliminary results obtained indicate that bovine palates can be decellularized and transformed into biological scaffolds in an attempt to treat periodontal lesions. Thus, morphological, and cellular interaction analyzes are still necessary for the development of a biological scaffold implant prototype.

Bibliographic references

- BADYLAK, S. F., TAYLOR, D., & UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual review of biomedical engineering*, 13, 27-53, 2011.
- CRAPO, P. M., et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(13), 3539-3547, 2012.
- NADERI, S., et al. Three-dimensional scaffold from decellularized human gingiva for cell cultures: glycoconjugates and cell behavior. *Cell Journal (Yakhteh)*, 15(2), 166, 2013.