



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA**



Eu, professor Marcelo Rocha Marques, declaro que estou ciente do envio da redação do TCC, intitulado “Cultivo tridimensional de odontoblastos em hidrogel”, realizado pela aluna Marília Avi de Mesquita, RA: 084502.

Piracicaba, 29 de setembro de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Marcelo Rocha Marques", written over a horizontal line.

Marcelo Rocha Marques



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA



# **Cultivo Tridimensional de Odontoblastos em Hidrogel de Nanofibras Formadas por Peptídeos**

**Aluna:** Marília Avi de Mesquita

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

UNICAMP

Piracicaba, outubro de 2011

Autora: Marília Avi de Mesquita

# **Cultivo Tridimensional de Odontoblastos em Hidrogel de Nanofibras Formadas por Peptídeos**

Orientador: Dr. Marcelo Rocha Marques, Departamento de Morfologia

Piracicaba, outubro de 2011

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

M562c Mesquita, Marília Avi de, 1990-  
Cultivo tridimensional de odontoblastos em hidrogel  
de nanofibras formadas por peptídeos / Marília Avi de  
Mesquita. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –  
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba.

1. Fosfatase alcalina. 2. Reação em cadeia da  
polimerase. 3. Técnicas de cultura de células. I.  
Marques, Marcelo Rocha, 1976- II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba. III. Título.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus avós Marília e Antônio;*

*Aos meus pais, Cássia e Marcílio,  
que acreditam em mim e com amor  
me dão todo apoio;*

*Ao meu namorado, Arcelino,  
meu grande amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

À direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

Em especial ao meu orientador, Marcelo Rocha Marques, que me ensinou, foi paciente e me incentivou tanto na elaboração deste trabalho como em toda minha vida acadêmica. Também pela amizade nesses anos de convívio.

Aos meus colegas de turma, principalmente aos mais presentes no meu dia a dia: Tais Munhoz Andrade, Larissa Lopes Rodrigues, Tamires Cristina Papetti, Bruna Cilene Martins da Silveira, Marcela Lacerda Viera, Conrado Reinoldes Caetano, Marina Alves Aleixo, Mariana Avollone Bosso, Nadia Muriano Brunharo e Ivan Solani Martins, que me ajudaram nos momentos difíceis e estiveram comigo nos melhores.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente a Gustavo Narvaes Guimarães que sempre me ajudou durante todo o trabalho.

Aos professores, que muitas vezes foram rígidos, mas não deixaram de ser grandes mestres em nos ensinar a melhor Odontologia.

## RESUMO

Tem sido demonstrado que o cultivo de células em matriz de 3 dimensões (3D), quando comparada a cultivo em 2D, pode mimetizar melhor *in vitro* as condições de interação célula/célula e célula/matriz extracelular que comumente podem ser observadas *in vivo*. Tal condição tridimensional de cultivo pode favorecer parâmetros que caracterizam fenotipicamente determinado tipo celular. Embora existam trabalhos sobre a polpa dental em cultivo 3D, pouco se sabe sobre o comportamento de odontoblastos nestas condições. Este estudo avaliou o efeito do cultivo de células odontoblásticas da linhagem MDPC-23, encapsuladas em um hidrogel (PuraMatrix), na proliferação e viabilidade celulares; expressão gênica de proteínas da matriz dentinária, atividade da fosfatase alcalina e deposição de nódulos mineralizados. Células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas encapsuladas e sobre um hidrogel (PuraMatrix). Como controle, células foram cultivadas sobre placas (ou poços) plásticas comuns para cultivo celular e sobre uma fina camada de hidrogel (coating). Após 1, 3, 5 e 7 dias foram avaliadas: proliferação e viabilidade celulares, que foi feita por meio do teste MTT; a atividade da fosfatase alcalina, que foi analisada utilizando-se um kit específico (Labteste); a deposição de nódulos minerais após indução por meio de diferenciação, a expressão gênica, que foi feita por meio de RT-PCR em tempo real para os seguintes genes: colágeno 1 (Col1a1), sialofosfoproteína da dentina (Dspp) e para fosfatase alcalina (Alpl). O cultivo celular em 3 dimensões aumentou a proliferação e viabilidade de células MDPC-23 nos dias 1 e 7. Para atividade de fosfatase alcalina, em todos os períodos analisados, o grupo encapsulado teve maior atividade da enzima em relação aos controles. O grupo coating teve maiores valores em relação ao grupo sem o hidrogel. O encapsulamento modulou apenas a expressão de mRNA para colágeno I, diminuindo a expressão deste gene. O cultivo tridimensional favoreceu fortemente a deposição de nódulos minerais. Os resultados indicam que o cultivo celular com o hidrogel PuraMatrix permite um cultivo tridimensional que modula padrões de comportamento, aproximando às condições espaciais que se observa *in vivo*.

**Palavras chave:** Hidrogel, Técnicas de Cultivo de Célula, Fosfatase Alcalina, Reação em Cadeia da Polimerase

## ABSTRACT

It has been shown that cell culture in a 3D matrix compared to a 2D culture can mimic better conditions in vitro with interactions of cell/cell, cell/extracellular matrix, which can be commonly observed in vivo. Three-dimensional cell culture may favor some important parameters in culture cell. There are many studies in a 3D culture for dental pulp, but little is known about odontoblasts behavior in these conditions. This study evaluated the effect of a three-dimensional culture for MDPC-23 cells-odontoblasts. Cells were encapsulated in a hydrogel (PuraMatrix) and as control, cells were cultured on plates (or wells) or with a thin layer of hydrogel. After 1, 3, 5 and 7 days were evaluated: proliferation and viability cells- with MTT test; alkaline phosphatase activity, analyzed with Labtest kit; mineral deposition and gene expression, PCR for genes: collagen 1 (COL1A1), sialoprotein of dentin (DSPP) and alkaline phosphatase (Alp). The 3-dimensional cell culture increased the proliferation and viability of cells MDPC-23 on days 1 and 7. For alkaline phosphatase activity in all periods analyzed, the encapsulated group had a higher ALP activity when compared to control groups. The coating group also had higher values compared to those without the hydrogel. Encapsulation only modulated the expression of mRNA for collagen I, decreasing the expression of this gene. The 3D culture cell increased the mineral nodule deposition. The results indicate that the cell culture with the hydrogel PuraMatrix allows a three-dimensional culture that modulates favorably its behavior patterns, approaching the spatial conditions that can be observed in vivo.

**Keywords:** Hydrogel, Cell Culture Techniques, Alkaline Phosphatase, Polymerase Chain Reaction.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Cultivo celular e Biomateriais.....	1
1.2 Cultivo celular em suporte 3D.....	2
1.3 Odontoblastos e Dentina.....	3
<b>2. JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO</b> .....	4
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	5
3. 1 Padronização da concentração de hidrogel.....	5
3.2 Teste de viabilidade e proliferação.....	6
3.3 Teste de fosfatase alcalina.....	7
3.4 Expressão gênica.....	8
3.4.1 Extração de RNA total .....	8
3.4.2 Transcrição Reversa.....	8
3.4.3 PCR quantitativo.....	9
3.5 Ensaio de Mineralização.....	10
<b>4. RESULTADOS</b> .....	11
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Cultivo celular e Biomateriais

A possibilidade do uso de cultivo celular em laboratório, certamente é uma das principais ferramentas para investigações científicas na área biomédica. Os avanços nos modelos e materiais usados nas técnicas de cultivo de células, cada vez mais buscam uma aproximação e reprodução *in vitro* de condições que podem ser observadas em tecidos *in vivo*.

As propriedades de crescimento celular *in vitro* são controladas pelas características do tipo celular utilizado, pelo material do substrato (suporte) para crescimento das células e pelo microambiente (meio e suplementos) a que são submetidas às células cultivadas. A interação entre as células e o substrato conduz a propriedades físico-químicas e cinéticas específicas; que podem definir alguns parâmetros de cultivo celular como: proliferação, viabilidade, migração e também expressão gênica <sup>(1,2,3)</sup>.

Devido à existência de métodos padronizados para a obtenção de culturas dos diversos tipos celulares, atualmente, dentre outras coisas, existe uma busca para obtenção de melhores veículos de crescimento. É importante que o substrato para o crescimento celular promova um envolvimento no qual as células possam manter seu fenótipo por meio da síntese de proteínas, e moléculas requeridas nativamente para determinado tecido <sup>(1,4,5)</sup>.

Dentre os tipos de suporte para crescimento celular mais utilizado em pesquisas recentes tem-se: placas, esponjas porosas, malhas, fibras e hidrogéis, que são obtidos principalmente a partir de polímeros como: poliestireno, peptídeos, colágeno, fosfato de cálcio, ácido poli-L-glicólico e ácido poli-L-lático. Em geral, polímeros sintéticos, em relação aos polímeros naturais, têm demonstrado ter maior potencial para uso em cultivo celular, isso porque aqueles podem ter sua fabricação mais controlada, de maneira a uniformizar as propriedades dos materiais utilizados. Além disso, a disponibilidade de fontes e por serem, em sua maioria, menos imunogênicos, polímeros sintéticos são bastante utilizados para cultivo celular <sup>(3,6)</sup>.

A partir do momento em que as células necessitam se ancorar na superfície de um determinado material para que ocorra o seu crescimento, fatores que influenciam na interação célula/material são importantes. Dentre os fatores relacionados ao material, incluem-se: porosidade, resistência mecânica, tamanho, elasticidade, densidade superficial, rugosidade superficial e características químicas

superficiais.<sup>(1)</sup> A determinação da superfície química dos materiais usados como substrato para células é dada pelos seus grupos funcionais livres. Isso afeta características como a carga e hidrofobicidade, o que têm importante papel no crescimento, adesão, proliferação e diferenciação celular <sup>(1)</sup>.

## 1.2 Cultivo celular em suporte 3D

Apesar da grande utilidade em pesquisas científicas, a maioria das formas convencionais de cultivo celular fornece condições “não naturais” de crescimento, o que pode limitar a interpretação de achados, principalmente quando se busca traçar analogias em relação ao comportamento celular *in vivo*. As condições “não naturais” de cultivo celular estabelecidas em laboratório, como por exemplo o crescimento de células em placas de plástico e o uso de suplementos não oriundos de organismos de mesma espécie das células cultivadas, podem promover estímulos que possivelmente irão modificar a fisiologia e morfologia das células em proliferação <sup>(11)</sup>.

A condição de crescimento celular em placas de plástico (crescimento em 2 dimensões -2D), não corresponde exatamente ao que ocorre em diferentes tecidos do organismo *in vivo*, em que se observam contatos célula-célula e matriz-célula em 3 dimensões (3D). Embora recentemente tenha aumentado o interesse e desenvolvimento de biomateriais e metodologias para cultivo celular em 3D, há vários anos tem se notado a importância de se estabelecer este tipo de cultivo <sup>(7,8)</sup>.

Estudos têm demonstrado algumas promissoras “vantagens” no uso de suporte 3D em cultivo celular. Liu *et al.*, 2006 verificaram que o uso de suporte 3D para o cultivo de células tronco embrionárias, favorece a diferenciação e aumenta a expressão de fatores de crescimento e moléculas de adesão <sup>(28)</sup>. Boukhechba *et al.*, 2009 demonstraram que o uso de um suporte 3D para crescimento celular, possibilita o estudo dos mecanismos de diferenciação de osteoblastos em osteócitos <sup>(29)</sup>. Zhong *et al.*, 2006 demonstraram que fibroblastos cultivados em suporte 3D de fibras colágenas alinhadas, orientam-se ao longo eixo das fibras <sup>(30)</sup>. Yang *et al.*, 2005 verificaram que células troncos neurais cultivadas em suporte 3D constituído por fibras alinhadas de ácido polilático, passam a exibir uma morfologia organizada, emitindo prolongamentos celulares no sentido do longo eixo das fibras <sup>(31)</sup>.

Morfologicamente, dentre os tipos de biomateriais mais utilizados em pesquisas para cultivo celular em 3D tem-se: esponjas porosas, malhas, fibras e hidrogéis<sup>(3)</sup>. Dentre estes biomateriais, os hidrogéis têm sido bastante utilizados para

testes de cultivo celular *in vitro* e também como veículo biofuncional para a condução de células cultivadas em laboratório para um leito tecidual *in vivo*<sup>(9,10)</sup>.

Os hidrogéis podem ter origem sintética, natural ou mesmo ser feitos de uma mistura entre estes dois tipos. Os materiais naturais que tem sido utilizado com sucesso em cultura de células 3D incluem: colágeno, alginatos, polissacarídeo, gelatina ligado à condroitim sulfato, celulose ligado a ácido hialurônico e colágeno ligado à glicosaminoglicanas<sup>(11)</sup>. Já dentre os materiais sintéticos que são utilizados em cultivo celular 3D, tem-se materiais à base de: polipeptídeos, ácido poli-lático (PLLA), ácido poli-glicólico PLGA, misturas entre PLLA e PLGA, misturas entre ácido PLLA e caprolactone e polietileno glicol<sup>(11)</sup>.

Diversos tipos celulares têm sido estudados quando cultivados encapsulados em hidrogéis formado por peptídeos<sup>(11,12)</sup>. O uso deste tipo de hidrogel, com peptídeos em pequenas concentrações, tem sido possível pela capacidade de auto-agregação destas moléculas ao serem estimuladas, em solução aquosa, por algum reagente específico, ou mesmo alteração de pH. A criação de redes de peptídeos após auto-agregação, pode fornecer uma porosidade tridimensional que suporta e favorece o crescimento, proliferação e diferenciação celular<sup>(11,13)</sup>.

### 1.3 Odontoblastos e Dentina

A dentina é uma estrutura complexa e heterogênea produzida por células denominadas de odontoblastos, sendo constituída por uma porção orgânica (proteínas colágenas e não-colágenas) e por outra porção mineralizada (hidroxiapatita). A maior parte da dentina circumpulpar é composta de dentina inter e peri-tubular, permeada pela matriz contendo os túbulos dentinários com os processos odontoblásticos.

Diversas moléculas produzidas pelos odontoblastos já foram identificadas na pré-dentina e dentina, dentre as quais se encontram proteínas colágenas como: colágeno do tipo I, III e V<sup>(14)</sup>. Dentre as proteínas não-colágenas, encontradas na porção orgânica da pré-dentina e dentina, destaca-se um grupo de certas proteínas que são denominadas Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glicoproteínas (SIBLINGs)<sup>(15)</sup>. Os elementos desta família incluem: fosfosialoproteína de dentina (DSPP) e, conseqüentemente, sialoproteína de dentina (DSP) e fosfoproteína de dentina (DPP), proteína de matriz da dentina 1 (DMP-1), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN). BSP e OPN são encontradas principalmente no osso, mas

também estão presentes em odontoblastos e dentina <sup>(14)</sup>. Algumas proteínas tais como, fosfoproteína de dentina (DPP) e sialoproteína de dentina (DSP), que por muitos anos acreditou-se estarem presentes exclusivamente na dentina <sup>(16)</sup>, foram também detectadas em células ósseas <sup>(17)</sup>. A proteína DMP-1 é expressa por ambos: osso e dentina <sup>(18)</sup>. O gene que codifica esta proteína (DMP-1) é encontrado perto do *locus* do gene da DSPP. Estudos *in vitro* têm demonstrado que estas proteínas (DMP-1 e DSPP) têm sido fortemente implicadas no crescimento do cristal de hidroxiapatita durante a dentinogênese <sup>(14)</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

Estudos utilizando suporte 3D para cultivo de células derivadas da polpa dentária já são feitos há vários anos. Estudos iniciais envolveram fibroblastos da polpa em matrizes sintéticas fabricados em fibras de ácido poliglicólico (PGA). Essas células foram capazes de se aderir a essas fibras, proliferando e desenvolvendo um tecido com uma similaridade celular de uma polpa normal <sup>(19)</sup>. Quando comparado ao hidrogel de colágeno tipo I e ao alginato, as fibras de PGA demonstram ser um tipo promissor para condução e proliferação de células pulpares <sup>(20)</sup>. Suporte biodegradável de fosfato de cálcio poroso também tem sido proposto para o uso na engenharia tecidual da polpa <sup>(21)</sup>. Estudos *in vitro* indicaram que o suporte de fosfato de cálcio não é tóxico para as células da polpa dental, e também permitem a aderência dessas células. <sup>(21)</sup>.

Dentre os diferentes hidrogéis constituídos por peptídeos tem-se o BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel (BD™ PuraMatrix™), que é uma matriz sintética que é utilizada para criar um microambiente tridimensional para uma variedade de experimentos de cultivo celular <sup>(22-27)</sup>.

O hidrogel Puramatrix é composto por 99% de água e 1% de aminoácidos, que em condições fisiológicas (na presença de algum tipo de sal, por exemplo) gera uma auto-agregação entre os aminoácidos, e conseqüente estabelecimento do hidrogel com estruturas fibrosas de escalas nanométricas. Já foi demonstrado que o hidrogel Puramatrix favoreceu a diferenciação de células progenitoras de hepatócitos, de neurônios do hipocampo e de células endoteliais. Estudos demonstraram que diferentes células de cultura primária (ex: fibroblastos, queratinócitos, neurônios) e linhagens estabelecidas (MG-63, SY5Y, HEK293 e NIH3T3) aderem facialmente a este hidrogel <sup>(22-27)</sup>.

Apesar de haver relatos na literatura de estudos de cultivo de células originadas da polpa dentária em suporte 3D, pouco ainda foi investigado nessa área de conhecimento, principalmente sobre estudos envolvendo odontoblastos. Partindo de um embasamento na literatura científica da importância do desenvolvimento e melhor entendimento do comportamento celular em cultura 3D, e sabendo-se que há uma necessidade de se conhecer melhor este tipo de cultivo para células odontoblásticas, este projeto se propõe a avaliar o efeito do cultivo de células da linhagem odontoblástica MDPC-23 encapsuladas em um hidrogel (PuraMatrix). Para tal estudo foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) proliferação e viabilidade celulares
- b) expressão gênica de proteínas da matriz dentinária
- c) atividade de fosfatase alcalina
- d) formação de nódulos minerais

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Para os experimentos realizados, foram utilizadas células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 que foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, USA) suplementado com 2% de FBS (Soro Fetal Bovino) (Sigma, USA), 100 units/ml Penicillina, e 100 µg/ml Streptomina (Invitrogen, USA), em uma incubadora com CO<sub>2</sub> a 5% e uma temperatura de 37°C.

Para a análise de comportamento do cultivo de células MDPC-23 em 3D, inicialmente as células foram encapsuladas em hidrogel PuraMatrix (BD Biosciences, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Como controles, células foram plaqueadas em uma fina camada de hidrogel "*coating*" nos poços, além disso, poços sem a presença do hidrogel foram utilizados.

#### **3. 1 Padronização da concentração de hidrogel**

Para estabelecer o encapsulamento celular, já a partir do primeiro momento de cultivo, era necessário que as mesmas fossem inicialmente ressuspensas em sacarose 10%, como recomendado pelo fabricante. Testes demonstraram que o contato das células com a sacarose, promovia intensa morte celular. Assim, estabeleceu-se que o encapsulamento seria feito apenas posteriormente ao estabelecimento da cultura. Desta forma, as células eram plaqueadas sobre o

hidrogel e em seguida ocorria uma migração das mesmas para o interior do hidrogel, como sugerido pelo próprio fabricante.

Para padronizar a concentração de PuraMatrix a ser utilizada, testes foram feitos com as seguintes concentrações: 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30% e 0,40% (com diluições feitas em água Mili-Q autoclavada). Cerca de 50 uL da solução de PuraMatrix era colocado em cada poço de uma placa de 96 wells, meio DMEM completo era adicionado lenta e cuidadosamente para promover a geleificação, em seguida o meio era trocado 3 vezes em 60 minutos. Depois, células MDPC-23 eram colocadas sobre o hidrogel, com isso em poucas horas as células ficavam encapsuladas, sem que houvesse morte celular visível.

A concentração escolhida de PuraMatrix para que fosse feito o encapsulamento e o *coating* foi de 0,40%. Isso foi concluído por análises microscópicas, em que se observavam células em diferentes dimensões tanto 2-3 horas após o plaqueamento, quanto após 1, 3, 5 e 7 dias.

Para o plaqueamento sobre o *coating*, utilizado como um dos controles do encapsulamento já que promove um cultivo bidimensional em contato com o hidrogel, os passos seguidos foram os seguintes: foi preparado um volume adequado de PuraMatrix na concentração de 0,40% diluindo-o com água, em seguida foi pipetado 5 uL da solução em placa de cultivo de 96 wells. A geleificação foi promovida adicionando lentamente meio de cultura sobre a PuraMatrix, seguida de incubação a 37°C durante 30-60 minutos, e substituindo o meio (50-60%) duas vezes durante este período. Feito este processo,  $2 \times 10^4$  células/mL em DMEM completo eram adicionadas.

O grupo que não teve PuraMatrix foi plaqueado com DMEM completo como rotina em poço plástico ( $2 \times 10^4$  células/mL).

### **3.2 Teste de proliferação e viabilidade celulares**

Para analisar proliferação e viabilidade celulares, foi utilizado o teste de MTT (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Neste teste, a redução de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) em formazan, por enzimas mitocondriais (redutases), gera uma alteração de cor que pode ser detectada por absorvância colorimétrica. Para tanto, cerca  $2 \times 10^4$

células/mL foram colocadas em uma placa de 96 *wells* da seguinte forma, para cada período experimental avaliado:

- . 3 poços para encapsulamento celular (por migração),
- . 3 poços para *coating*,
- . 3 poços para controle (células em meio sem PuraMatrix),
- . 2 poços para controle de encapsulamento (PuraMatrix sem células),
- . 2 poços para controle de *coating* (PuraMatrix sem células), e
- . 2 poços somente com meio de cultura padrão.

Após 1, 3, 5 e 7 dias de cultivo, 20 uL de Dye Solution foram adicionados a cada poço e então era incubado por 3 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado 100 uL Stop Solution a cada poço e após nova incubação a 37°C por 1 hora, era realizada uma leitura em um aparelho de Elisa por meio de absorbância colorimétrica (590nm).

### **3.3 Teste de atividade de fosfatase alcalina**

Para os testes de atividade de Fosfatase Alcalina, utilizou-se o “kit” Labtest (Labtest Brasil). Para tanto,  $2 \times 10^4$  células/mL foram colocadas em uma placa de 96 wells da seguinte forma para cada período experimental avaliado:

- . 3 poços para encapsulamento celular (por migração),
- . 3 poços para *coating*,
- . 3 poços para controle (células em meio sem PuraMatrix),
- . 2 poços para controle de encapsulamento (PuraMatrix sem células),
- . 2 poços para controle de *coating* (PuraMatrix sem células), e
- . 2 poços somente com meio de cultura padrão.

Após 1, 3, 5 e 7 dia de cultivo, as células passaram por 5 ciclos de choque térmico, alternando 15 minutos em 37°C e 20 minutos em -20°C, para lisar as células. Este “kit” usa um princípio em que a Fosfatase Alcalina faz a hidrólise de uma substância denominada timolftaleína monofosfato, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, foi medida em 590nm, por absorbância colorimétrica.

### **3.4 Expressão gênica**

#### **3.4.1 Extração de RNA total**

Para os ensaios de expressão gênica, células para todos os grupos foram cultivadas como descrito no item 1.2, em placas de 6 *wells*. Após 1, 3, 5 e 7 dias de plaqueamento o RNA total será isolado com o uso do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o meio de cultura foi aspirado e as placas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS-Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA). Dois mililitros do reagente Trizol<sup>®</sup> foram adicionados em cada poço, e esse volume foi exaustivamente aspirado e reaplicado, e depois o seu conteúdo (células desprendidas + reagente Trizol<sup>®</sup>) foi transferido para um tubo de 15ml de polipropileno e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada tubo de polipropileno foi adicionado 0,3ml de clorofórmio (Merck, Frankfurt, Alemanha) sendo estes agitados cuidadosamente em “vortex”, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 9500rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, o qual foi adicionado 1,5ml de isopropanol (Merck, Frankfurt, Alemanha), sofrendo agitação em “vortex” e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Novamente os tubos foram centrifugados a 9500rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 75% gelado e seco a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram ressuspendidas em água Mili-Q (Rnase free) e então, armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 1µl (diluição 1:100) foi utilizada para a obtenção da concentração e pureza de RNA das amostras por meio de um espectrofotômetro (260/280).

Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, 1µg de cada amostra foi separada em um gel de agarose a 1,2%, por meio de eletroforese a 100V constante, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado através do programa Image Master VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença das bandas do RNA ribossômico (28S e 18S).

#### **3.4.2 Transcrição Reversa**

As amostras de RNA extraídas, com comprovada boa qualidade e pureza, foram tratadas com 1 U de Dnase I/ug de RNA por 10 minutos a 24°C, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, cerca de

1µg de RNA total de cada grupo foram reversamente transcritos em uma reação com volume final de 21µl contendo 0,5mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNAase, 50 U de enzima Superscript III RT (Invitrogen), 0,5µg de primers oligo-dT e tampão de reação 1X, contendo 1,5mM MgCl<sub>2</sub>. Esta solução foi incubada por 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C, finalizando a 4°C por 1 minuto. Em seguida, a solução foi incubada por 20 minutos a 37°C com 2U da enzima Rnase H (E.coli). Reações sem a presença da enzima RT foi usadas como controles negativos.

### 3.4.3 PCR quantitativo

A expressão de mRNA para: colágeno do tipo I, alfa 1 (Col1a1), sialofosfoproteína da dentina (Dspp) e para fosfatase alcalina (Alpl), foram analisadas utilizando reações de PCR em tempo real, pelo sistema SYBRGreen. Os iniciadores da PCR adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos encontradas no *GenBank*. A reação quantitativa PCR em tempo real foi realizada no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) utilizando o sistema *Fast-Start DNA Master Plus SYBR Green kit* (Applied Biosystems.). Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados: 4µl do reagente do kit, 10 µl de água nuclease-free, 0,5 µl da solução contendo cada primer (10µM) e 5 µl de cDNA.

Para a análise da expressão gênica, como no caso deste estudo, utilizou-se a expressão relativa, onde o dado é normalizado de acordo com a expressão de um gene constitutivo, chamado de gene de referência. Neste experimento o gene de referência a ser utilizado para PCR em tempo real foi o GAPDH.

O quadro 1 mostra as seqüências de primers previamente escolhidas para serem utilizadas nas reações de RT-PCR em tempo real.

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Amplicon
<i>Alpl</i>	5`CAGACACAAGCATTCCCCTA 3`	5`TTTGAGGTTTTTGGTCAGGAT 3`	193pb
<i>Col1a1</i>	5`GTCAGCAGATTGAGAACATCC 3`	5`TGAGTAGGGAACACACAGGTC3`	196pb
<i>Dspp</i>	5`GTGGCCCTCAAACCTTAAATA 3`	5`ACGCACAGCCTTACA ACTCT 3`	150pb
<i>GAPDH</i>	5`GTGCTGAGTATGTCGTGGAGT 3`	5`TTGTCATATTTCTCGTGGTTCA 3`	154pb

**Quadro 1** – Seqüências de primers utilizadas nas reações de RT-PCR em tempo real.

### 3.5 Ensaio de Mineralização

Para a avaliação da formação de nódulos minerais, as células foram cultivadas tridimensionalmente (além dos controles bidimensionais : coating e só em placa) em placas de 24 poços. Após atingirem confluência as células receberam, por um período de 14 dias, meio osteogênico contendo: DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) para promover a formação de colágeno e matriz extracelular, e 2mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, USA) para formação e mineralização de nódulos em multicamada, em placas de 6-poços (TPP®, Switzerland). Ao final de 14 dias, o meio foi removido, os poços foram lavados com solução tampão (PBS-Gibco BRL, life

technologies, Rockville, MD, USA) e preenchidos com solução fixadora de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, os poços foram desidratados em uma série de soluções alcoólicas crescente e corados com Alizarin red S a 2% (Sigma-Aldrich, USA), pH=4,2, por 10 minutos, corando em vermelho os nódulos e mineralização, ricos em cálcio.

A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico. Foram adicionados 280 µl de ácido acético a 10% a cada poço previamente corado com vermelho de alizarina, e a placa foi levada ao agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo eppendorf, e então aquecidos a 85°C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram levados para centrifuga a 20.000g por 15 minutos, e 100 µl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo. Então 40 µl de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados a cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 µl) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm.

#### 4. RESULTADOS

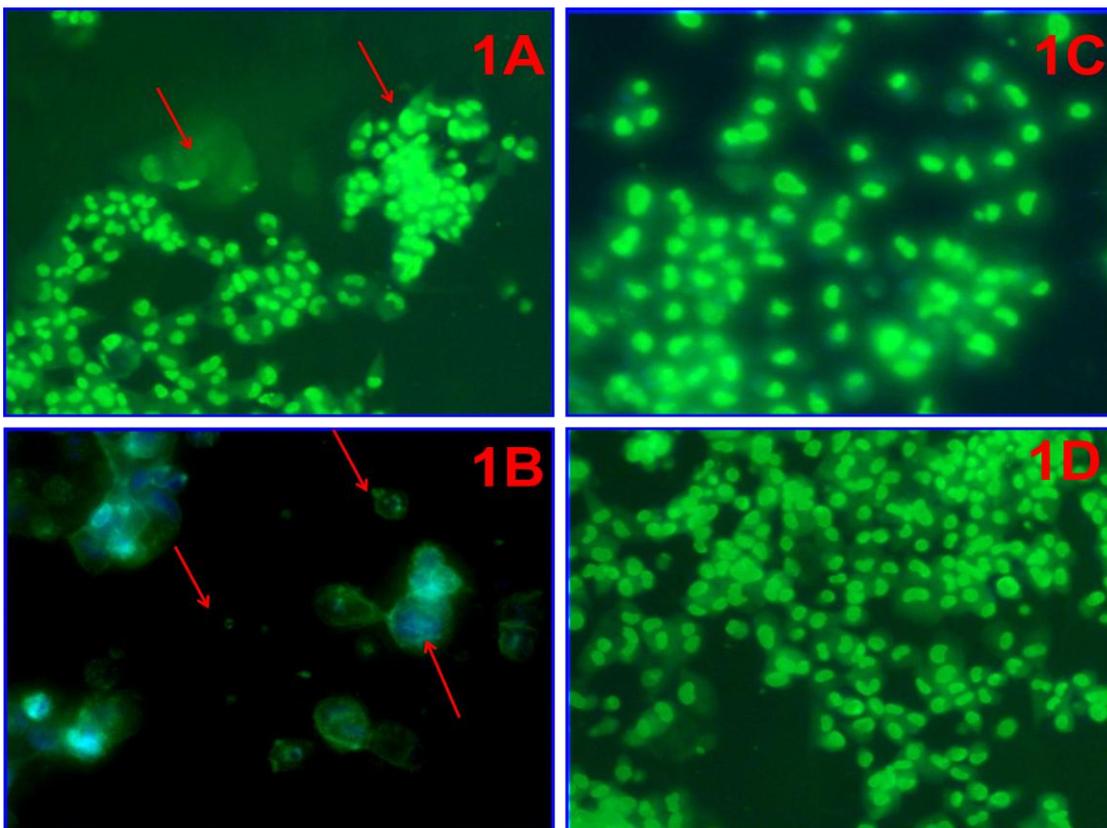
Os resultados apontaram que o cultivo celular em 3 dimensões no hidrogel PuraMatrix, aumentou a proliferação e a viabilidade de células MDPC-23 após 1 e 7 dias ( $p < 0,01$ ). O cultivo bidimensional de células MDPC-23 sobre o *coating* de Puramatrix, demonstrou comportamentos similares aos observados ao cultivo bidimensional diretamente sobre o poço plástico (*well*) Fig. 1. ( $p > 0,05$ ). Figura 2

A análise dos dados obtidos para o teste de atividade de fosfatase alcalina demonstrou que em todos os períodos analisados o encapsulamento celular promoveu aumento significativo, com valores de  $p < 0,05$  para os dias 1 e 3; e de  $p < 0,01$  para os dias 5 e 7 da atividade desta enzima. Pôde-se observar que quanto maior o tempo de cultivo, mais significativa era a diferença do grupo de células encapsuladas por PuraMatrix em relação aos outros grupos. Figura 3

Adicionalmente, o grupo em que as células foram cultivadas bidimensionalmente sobre o *coating* de PuraMatrix, teve uma tendência a ter maiores valores de atividade de fosfatase alcalina em relação ao grupo sem este hidrogel, embora apenas após 5 dias de cultivo essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

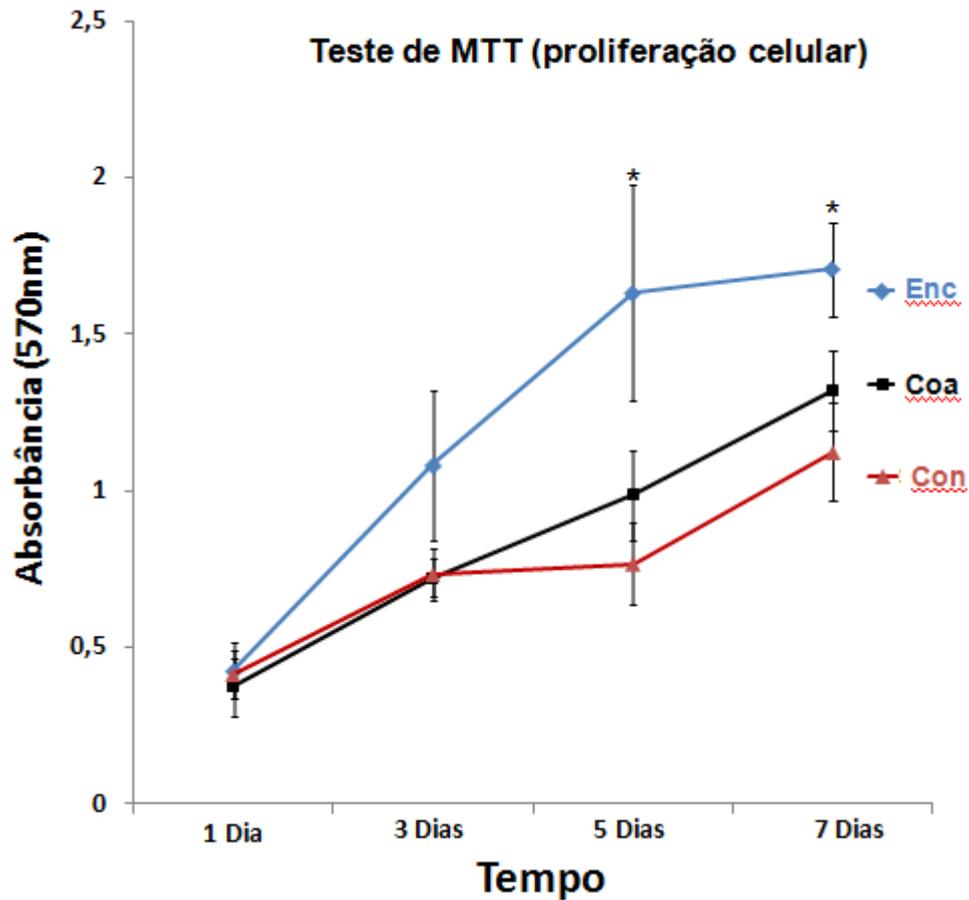
Em relação aos dados obtidos para expressão gênica (Figura 4) pôde-se observar que o encapsulamento celular modulou apenas a expressão de mRNA para o colágeno I, de forma que o cultivo tridimensional diminuiu a expressão deste gene.

A análise da formação de nódulos minerais demonstrou que o cultivo tridimensional aumentou significativamente este parâmetro, de forma que houve um aumento aproximadamente 30 vezes a deposição de no cultivo de células encapsuladas, quando comparado ao controle ( $p < 0,01$ )

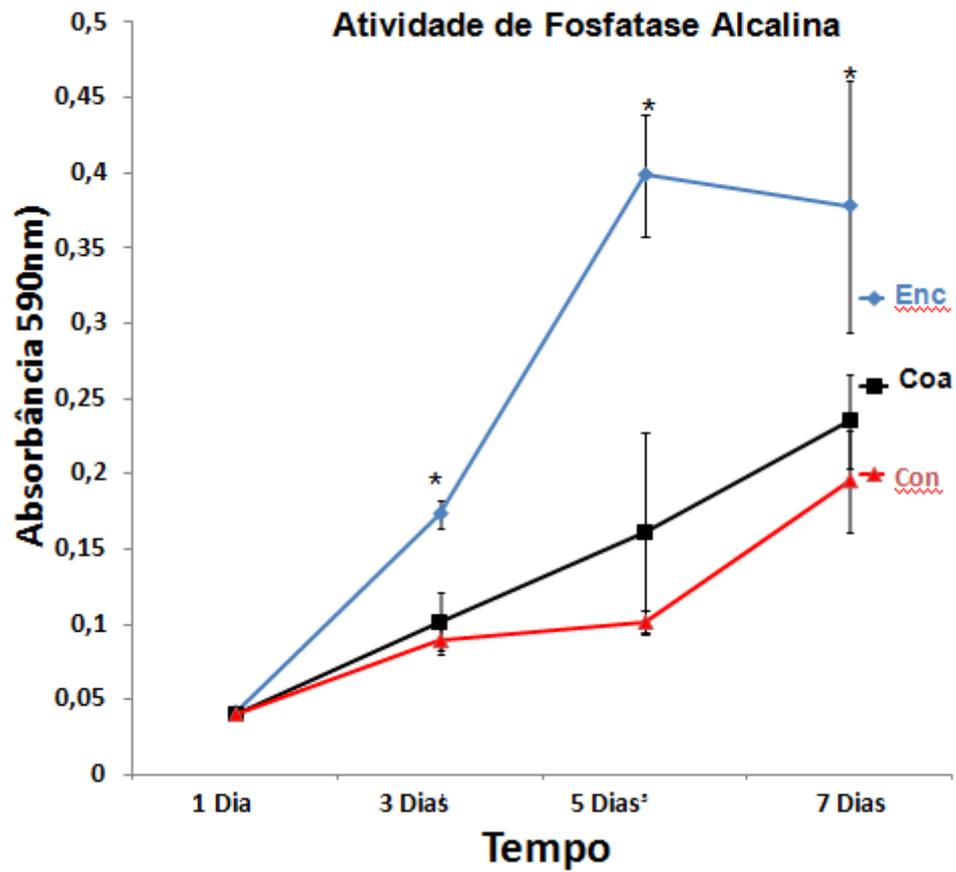


**Figura 1.** Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia de fluorescência, a partir de cultivo realizado após 24hs. 1A: MDPC-23 cultivadas encapsuladas; 1B: MDPC-23 cultivadas encapsuladas (maior Aumento); 1C: MDPC-23 cultivadas em

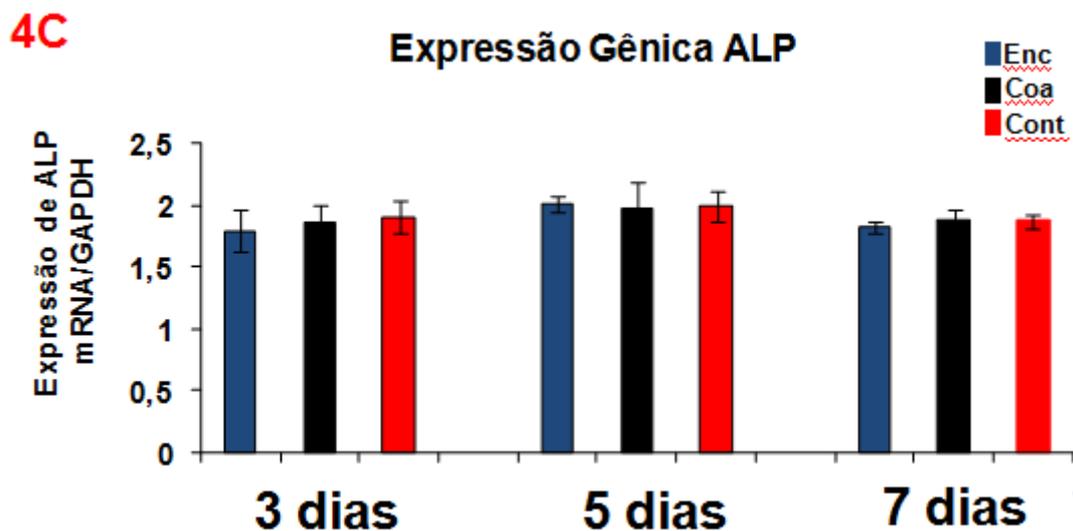
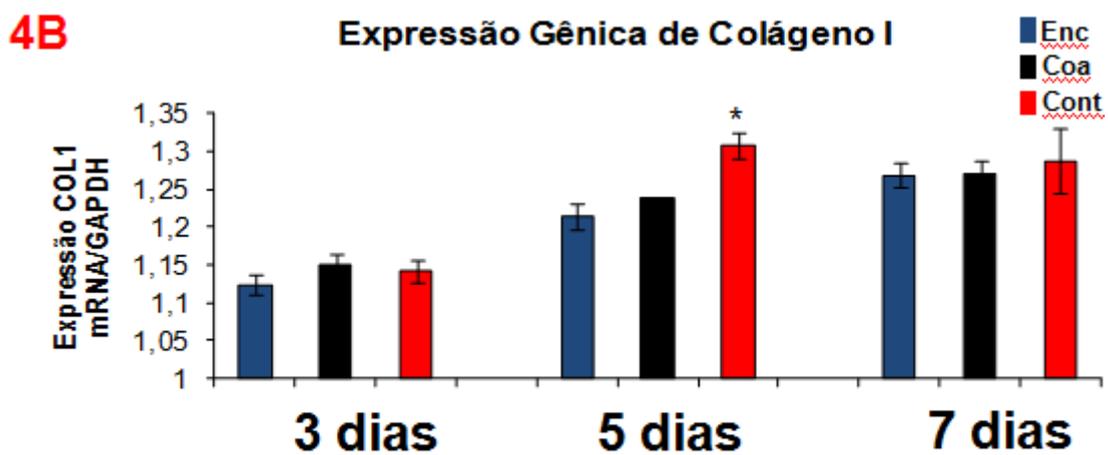
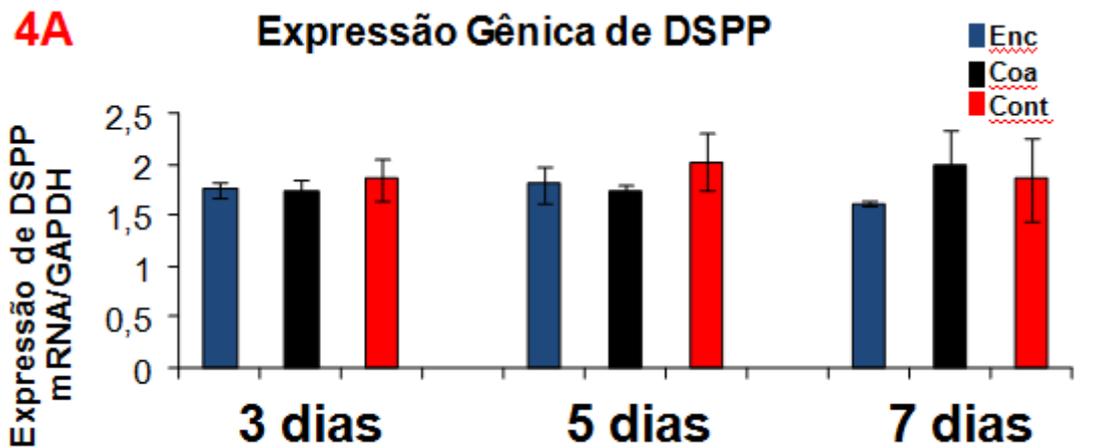
coating; 1D: MDPC-23 cultivadas em plástico. Notar setas vermelhas indicando células posicionadas em diferentes alturas (focos diferentes).



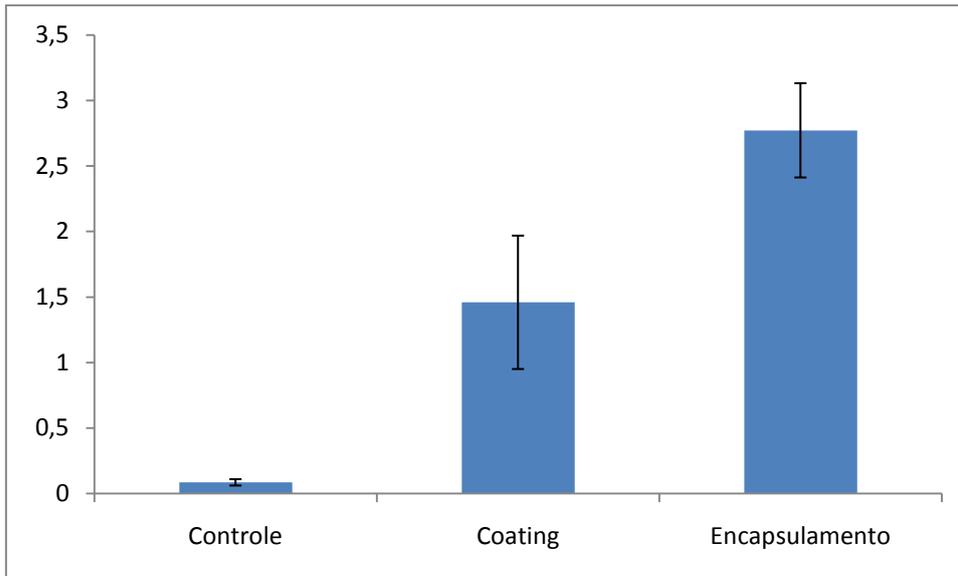
**Figura 2.** Gráfico representativo das médias  $\pm$  dp dos valores obtidos para os ensaios de viabilidade celular. (\*) representa diferença estatística entre os Outros grupos do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$



**Figura 3.** Gráfico representativo das médias  $\pm$  dp dos valores obtidos para os ensaios de atividade de fosfatase alcalina. (\*) representa diferença estatística entre os outros grupos do mesmo tempo experimental,  $p < 0.05$ .



**Figuras 4A, 4B e 4C.** Gráfico representativo das médias  $\pm$  dp dos valores obtidos para os ensaios de Expressão gênica. **4A** – DSPP, **4B** – Colágeno I, **4C** – ALP (Fosfatase Alcalina). (\*) representa diferença estatística entre os Outros grupos do mesmo tempo experimental,  $p < 0,05$ .



**Figuras 5.** Gráfico representativo das médias  $\pm$  de dos valores obtidos de absorvância (unidades arbitrárias) para o teste de mineralização. Os 3 grupos foram estatisticamente diferentes entre si, e no grupo encapsulamento observou-se maior deposição de minerais.

## 5. DISCUSSÃO

O cultivo celular em 3 dimensões pode melhor mimetizar as condições que se tem *in vivo* pela ocorrência da interação entre célula/ célula e célula/ matriz extracelular. Isso não ocorre quando as células são cultivadas em 2 dimensões (célula cultivada diretamente na poço), em que há apenas interação entre célula/célula.

Os resultados obtidos demonstraram que foi possível estabelecer um cultivo tridimensional de células de linhagem odontoblástica MDPC-23, por meio do hidrogel PuraMatrix. O encapsulamento foi feito por migração, em que a maioria das células permaneceu viável e em condições favoráveis, sendo cultivadas por no máximo 7 dias. O cultivo tridimensional pode ser visualizado pelas fotomicrografias feitas por meio de marcadores fluorescentes, em que demonstraram células em diferentes “alturas” após o processo de encapsulamento celular por Puramatrix, isso permitiu a interação entre as células odontoblásticas com sua matriz extracelular, modulando importantes parâmetros.

Muitas matrizes para o cultivo celular tridimensional são derivadas de animal, que contém uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, antígenos e patógenos, que de alguma forma podem influenciar nos resultados<sup>33</sup>.

Tem sido demonstrado que o biomaterial PuraMatrix pode mimetizar a estrutura e função biológica da matriz extracelular por sua composição química que possibilita a similaridade com as fibras e os poros encontrados nesta matriz e por sua estrutura física, com característica fluída<sup>34</sup>.

Sihong *et al.*, 2007 demonstraram que quando hepatócitos são cultivados no hidrogel PuraMatrix tem-se resultados maiores de secreção de albumina e uréia na primeira semana quando comparado a uma matriz de colágeno, além disso, o potencial da membrana mitocondrial era maior após 1 dia de cultivo, sugerindo que há melhor preservação estrutural da célula e que a cultura de células encapsuladas é mais parecido com o que ocorre *in vivo*<sup>35</sup>. Wang *et al.*, 2010 estudaram a influência de diversos hidrogéis na síntese da matriz extracelular durante o cultivo de condrócitos bovinos e puderam perceber que as células ficam distribuídas e morfologicamente diferentes em cada hidrogel. No hidrogel Puramatrix, houve tanto migração por seus poros como adesão as nanofibras, também foi nesse hidrogel que houve maior acúmulo de matriz extracelular e de colágeno em relação aos outros, que perdiam esse material para o meio de cultura ao redor<sup>36</sup>.

Já Tomouki *et al.*, 2011, utilizaram o hidrogel PuraMatrix *in vivo* em cães, para um estudo sobre a osseointegração de implantes dentários com células mesenquimais indiferenciadas. Puderam demonstrar que o material pode ser usado como matriz celular, obtendo-se sucesso na reparação óssea em volta dos implantes, quando comparado com um implante sem as células mesenquimais no hidrogel<sup>37</sup>. Patrick Allen *et al.*, 2011 também realizaram um estudo *in vivo* com camundongos, testaram como seria a formação de vasos a partir de células endoteliais progenitoras e mesenquimais progenitoras em diferentes matrizes: colágeno tipo I, fibrina e PuraMatrix. A formação de vasos em uma matriz de hidrogel Puramatrix foi muito maior quando comparado com os outros dois materiais, quando injetada nos animais com células endoteliais progenitoras. Para células mesenquimais progenitoras, a formação de vasos foi parecida<sup>38</sup>. Henriksson *et al.*, 2009 utilizaram o hidrogel PuraMatrix para um estudo com células tronco mesenquimais humanas. Os pesquisadores causavam injúrias em discos vertebrais de porcos e depois de 2 semanas injetavam, no local, as células mesenquimais em meio ou em uma matriz de PuraMatrix. As células que estavam na matriz do hidrogel, tiveram maior facilidade de permanecer vivas e se diferenciar em condrócitos nos discos vertebrais<sup>39</sup>.

A área que estuda engenharia tecidual vem crescendo muito, por isso, o desenvolvimento deste assunto é de grande importância e relevância no setor da saúde. Além de células específicas, células mesenquimais indiferenciadas são utilizadas nos estudos com algum fator, buscando a sua diferenciação. Isso poderá ser utilizado na terapia de células tronco, como também para outros tipos de tratamento. Com o uso de uma matriz celular, pode-se ter resultados otimizados nesses tratamentos, porque muitas vezes, o insucesso ocorre pela morte celular, não apenas por uma reação de rejeição do organismo. Mas para que o resultado seja realmente melhor, primeiro deve-se saber qual o melhor tipo de matriz para cada tipo de célula.

Nesse estudo, após a padronização da concentração ideal do hidrogel para o encapsulamento, foi possível investigar padrões celulares importantes dos odontoblastos, como proliferação e viabilidade, além de atividade de Fosfatase Alcalina, e expressão gênica de marcadores importantes dessas células. Os dados mostraram que o cultivo tridimensional pode modular, em alguns tempos

experimentais, de maneira favorável os parâmetros analisados, embora não influencia em nada a expressão de genes importantes como a DSPP.

Adicionalmente, ao induzir células odontoblásticas à deposição de nódulos minerais, foi possível observar que o cultivo tridimensional favoreceu fortemente a deposição dos mesmos. O tempo de cultivo por 14 dias foi o suficiente para que as células encapsuladas em hidrogel promovesse a deposição de quase 30 vezes mais de cálcio, quando compara às células cultivadas bidimensionalmente.

Com esses resultados pode-se sugerir que o hidrogel PuraMatrix é um biomaterial que permite o cultivo de células MDPC-23 em 3 dimensões, o que melhora alguns parâmetros: proliferação e viabilidade nos dias 1 e 7 e fosfatase alcalina em todos os dias, além de favorecer a deposição de cristais minerais.

## **6. CONCLUSÃO**

Pode-se concluir, com os resultados obtidos, que o hidrogel Puramatrix permite o encapsulamento de células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Além disso, os resultados demonstraram que o cultivo tridimensional muda padrões de comportamento destas células quando comparado a cultivo bidimensional. Sendo assim, por saber que o cultivo em 3 dimensões, a princípio, melhor se aproxima das condições espaciais que se observa odontoblastos *in vivo*, pode ser interessante que experimentos, que de alguma forma estudem o comportamento de odontoblastos, sejam desenvolvidos em cultura tridimensional.

## REFERÊNCIAS

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering-Review. *Science* 1993;260:920-926.
2. Chai C, Leong KW. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther.* 2007;15:467-80.
3. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:215-28.
4. Wang YK, Yong T, Ramakrishna. Nanofibers and their influence on cells for tissue regeneration. *Aust J Chem.* 2005;58:704-712.
5. Tuzlakoglu K, Reis RL. Biodegradable polymeric fiber structures in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15:17-27.
6. Seunarine K, Gadegaard N, Tormen M, Meredith DO, Riehle MO, Wilkinson CD. 3D polymer scaffolds for tissue engineering. *Nanomed.* 2006;1:281-96. J
7. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:297-303.
8. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989;109:317-30.
9. Meng H, Chen L, Ye Z, Wang S, Zhao X. The effect of a self-assembling peptide nanofiber scaffold (peptide) when used as a wound dressing for the treatment of deep second degree burns in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89:379-91.
10. Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9996-10001.
11. Dutta RC, Dutta AK. Feb 14. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv.* 2009;27:334-9.
12. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2008 ;84(1):128-36.
13. Ye Z, Zhang H, Luo H, Wang S, Zhou Q, DU X, Tang C, Chen L, Liu J, Shi YK, Zhang EY, Ellis-Behnke R, Zhao X. Temperature and pH effects on

- biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-I. *J Pept Sci*. 2008;14(2):152-62.
14. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, Salih E, Stanislawski L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res*. 2001; 15: 91-5.
  15. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*. 2003; 44: 33-40.
  16. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleaved products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem*. 1997; 272: 835-842.
  17. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res*. 2002; 81:392-394.
  18. George A, Sabsay B, Simonian PAL, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1993; 268: 12642-12630.
  19. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*. 1996 2(6):865-8.
  20. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym*. Ed. 1998;9(7):749-64. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):477-83.
  21. Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the three-dimensional culture of dental pulp cells.
  22. Semino CE, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*. 2003 (4-5):262-70.
  23. Holmes TC, de Lacalle S, Su X, Liu G, Rich A, Zhang S.. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 6;97:6728-33.

24. Semino CE, Kasahara J, Hayashi Y, Zhang S. Entrapment of migrating hippocampal neural cells in three-dimensional peptide nanofiber scaffold. *Tissue Eng.* 2004;10(3-4):643-55.
25. Narmoneva DA, Oni O, Sieminski AL, Zhang S, Gertler JP, Kamm RD, Lee. Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(23):4837-46.
26. Zhang S, Holmes TC, DiPersio CM, Hynes RO, Su X, Rich A. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials.* 1995;16(18):1385-93.
27. Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, Zhao X, Wu P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain Res.* 2008 Jan 2;1187:42-51.
28. Liu H, Lin J, Roy K. Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials.* 2006;27(36):5978-89.
29. Boukhechba F, Balaguer T, Michiels JF, Ackermann K, Quincey D, Bouler JM, Pyerin W, Carle GF, Rochet N. Human Primary Osteocyte Differentiation in a Three-Dimensional Culture System. *J Bone Miner Res.* 2009 May 6.
30. Zhong S, Teo WE, Zhu Xiao, *et al.* An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effect on in vitro fibroblast culture. *Journal of Biomed Mater Res Part A.* 2006;79:456-463.
31. Yang F, Murugan R, Wang S and Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:2603-2610.
32. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edeards CA, Wataha JC, Ritchie HH, *et al.* Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Res.* 1998;37(3-4): 233–249.
33. Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. 2005 Jun 14;102(24):8414-9.
34. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Kobayashi H. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells using self-assembled peptide amphiphile nanofibers. *Biomed Mater.* 2006 Mar;1(1):8-15.

35. Wang S, Nagrath D, Chen PC, Berthiaume F, Yarmush ML. Three dimensional primary hepatocyte culture in synthetic self assembling peptide hydrogel. *Tissue Eng Part A*. 2008 Feb;14(2):227-36.
36. Wang QG, Hughes N, Cartmell SH, Kuiper NJ. The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profile. *Eur Cell Mater*. 2010 Feb 26;19:86-95.
37. Kohgo T, Yamada Y, Ito K, Yajima A, Yoshimi R, Okabe K, Baba S, Ueda M. Bone regeneration with self-assembling Peptide nanofiber scaffolds in tissue engineering for osseointegration of dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2011 Jul-Aug;31(4):e9-e16
38. Patrick Allen, Juan Melero-Martin, Joyce Bischof. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Apr;5(4):e74-86.
39. Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, Hagman M, Horn M, Lindahl A, Brisby H. Transplantation of Human Mesenchymal Stems Cells Into Intervertebral Discs in a Xenogeneic Porcine Model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Jan 15;34(2):141-8.