VINICIUS ROSA

**Engenharia de tecidos com células-tronco de dentes decíduos e *scaffolds*
injetáveis e a formação de polpa dental funcional**

São Paulo

2010

VINICIUS ROSA

**Engenharia de tecidos com células-tronco de dentes decíduos e *scaffolds*
injetáveis permite a formação de polpa dental funcional**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Doutor pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosa H. M. Grande
Co-Orientador: Prof. Dr. Jacques E. Nör

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosa V. Engenharia de tecidos com células-tronco de dentes decíduos e *scaffolds* injetáveis e a formação de polpa dental funcional [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

São Paulo, 07/07/2010

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho amigo aquele que em meus primeiros dias na paulicéia desvairada setenciei “orientador *ad æternum*”, Álvaro Della Bona, o homem que primeiro acreditou e que presenteou com um despertador ao embarcar para terra Michigander.

Foi naquela manhã nem tão ensolarada manhã do longínquo 25 de abril de 2003 que o professor, como sempre teimei em chamar, me mostrou o quão desafiador e gratificante é o pesquisar como verbo.

Graças a tua vigília, de poucos, comigo, que aprendi as primeiras noções e várias nuances de um mundo fascinante e desafiador que se abriu e que, com alta quantidade de carinho e dedicação e até determinado nível de inteligência e esperteza, resolvi trilhar.

Este trabalho não está descrito sem detalhes (como de costume) nas páginas que teimam em amarelar de um certo caderno (este sim, de capa amarela) meu. Ainda assim, dedico estas noventas e poucas páginas a ti, como valimento dos anos que ficaram para trás, dos que estão por vir. Um não tão vão reconhecimento por todas as oportunidades que me criaste sem esperar em troca nada, pela família linda que me recebe como se filho fosse, por ser o amigo de sempre e por me chamares de mano.

Álvaro, é a ti que dedico esse trabalho amigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por sempre escutar as minhas orações das noites em que dormi antes de fazê-las.

Ao meus pais Daltro e Gladis, os dois que existem como um

Por dedicarem suas vidas para a realização da minha. Por eu nunca ter precisado me preocupar com nada além da minha realização e a desse trabalho. Por sempre terem os olhos e o coração voltados para a minha vida. Por chorarem escondido para não me preocuparem. Por me virem a lembrança e me fazerem chorar escondido para não deixar-vos preocupados. Se chora por amor.

Ao meus irmãos Luciano, o Primeiro, e Ricardo, o Terceiro

Por serem os irmãos de sempre, nas boas e nas ruins. Por terem a palavras e serem as pessoas que nunca deixaram de alentar nas horas em que em que a derrota tomou corpo e que entoaram os pingos de amor quando o triunfo nosso se revelou.

À minha namorada Deborah, a namorada vela

A namorada vela é que impulsiona, empurra somente para frente, sempre. A namorada que eu amo. Ao amor que se fez presente em todos os dias, que esteve ao meu lado e foi minha família quando havia uma América Central me separando dos que eu amo. Muito obrigado por sempre ouvir, por aguentar o meu rabujar, por me fazer sorrir e estender por um longo tempo o último minuto de conversa de todas as noites. Obrigado por me amar e me fazer dormir, enfim. Um obrigado especial a Dona Denise, a vó Cecília e ao amigo Mario Mateiro e ao Danilo por me receberem sempre com amor e torcerem pelo sucesso desse trabalho.

Ao meu amigo Jacques Eduardo Nör, o Gremista de Ann Arbor

Não ha como não escrever para eternizar o que foi dito na sala 2309 da School. Faltam as palavras mas não o sentimento por ter acreditado em meu ideal, por ter suportado minhas decepções nos muitos momentos em que tudo teimou em dar errado e por incitar que mais sempre era possível e necessário. Obrigado a Silvia pelo carinho e ao Lucas pelas risadas e pelo desenho. O Gremista de Ann Arbor fala ao apagar das luzes que tem orgulho do meu trabalho e isso basta para que tudo se justifique. O Jacques é um dos três que ouço e sigo e obedeço cegamente e professor, bem como pediste pra não te chamar, esse é o maior sinal de gratidão e lealdade que posso te oferecer. Muito obrigado nunca vai ser o bastante e nada o será.

A tia, ou Rosa Helena Miranda Grande como está na sua identidade

A tia Rosa sempre esteve por perto. A tia se desdobrou, a tia falou, a tia nunca hesitou. Tia, foi numa noite de quinta-feira em que me avisaste que meus anos seriam em São Paulo. Foi em uma terça a noite que te avisei que o ano seria sim em Michigan e que tuas palavras ternas embarcariam comigo naquele Delta no março. Porque a tia sempre esteve ali. A tia leu, escreveu, perguntou (e muitas das pergunta eu esqueci de responder nos próximos 3 emails), organizou. A Rosa de nome, facilitou meu ano acima do Equador no que podia, e no que não conseguia também! Tia Rosa, o teu choro faz tudo valer. A tua

lágrima do nosso orgulho me enche de felicidade. A honra foi minha. Tia Rosa, como dizem aqueles que seguem o meu tricolor, eterna em meu coração.

A Fabiana Soki e Rubens S. Ribeiro, os pais da Pucca!

Por todo o carinho, por toda a companhia, por todos, literalmente todos os programas aos quais nunca dissemos não. Impossível imaginar como teriam sido os meus dias sem a companhia de vocês. A amizade construída em Sampaio tomou dimensões familiares que tornou cada dia mais leve e divertido. Fabi, as nossas aspirações são grandes (acredita!) e Doc, tu é exemplo de perseverança e dedicação. Com vocês tudo ficou sempre melhor. Doc, estenda o meus agradecimentos aos filipinos Mannelito e a família Pacquiao. Obrigado por tudo e por sempre.

Ao Bruno Neves Cavalcanti e Márcia Sampaio Campos, a família

Por terem me ensinado os caminhos do laboratório, por se importarem e fazerem sempre o que precisei. Por todas as longas conversas, nem tão nutritivos almoços, e por toda a atenção dispensada a mim. Se esse trabalho chega as mãos de vocês hoje é porque os seus nomes constam nessa seção. Que sigamos destruindo por muito tempo juntos os Guitar Hero's e Band Hero's da vida (não que tenhamos tempo de jogar, ocasionalmente apenas!) Família é para sempre, como sabiamente o poeta (no caso eu) costumava dizer. Muito obrigado por me acolherem e me cuidarem.

To my labmates, the gentle people from 2310G

Thank you for allowing me to make noise in your place! Nobody could imagine how funny would it be after all. Notwithstanding the fact (love this phrase) we used even to work, the fact that we had fun all the time (even moving the lab!) will be remain petrified in my heart. People from such different places making jokes and contaminating the room with a huge sense of humor: the funniest place to struggle against the time to have it all done. From USA (Land of the Free, Home of the Brave) Kristy Meyers and Jacob Williams; from India Sudha Krishnamurthy; from China Zhihong Dong, Zhaocheng Zhang, and Jing Wang; from Colombia Tatiana Botero; from Iraq Tara Beebani; from Brazil (meu Brasil brasileiro...) Leticia Bento and Renata Licks; from South Korea Yun Chan Hwang and Kyung-San Min, from Taiw... sorry, Japan Atsushi Imai and Yoriko Imai, thank you for all the patience and love during all the time. I want to know the place you live ... please send me the tickets! Zhigong and Zhang: ok! I know, I'm a boiola!

To the others labmates

Benjamin Zeitlin, Boyo (dude in Welsh) thank you for being such a good friend that always wanted me to raise as a good scientist. **Marcos Santos** pelas estafantes conversas sobre futebol, longas horas desatolando carro na neve (foi mal!) e por todas as risadas boas divididas. **Fernanda Visioli** pela amizade, pelos momentos compartilhados de desespero e por todos (mas todos!) antigen retrievals. Thank you **Golletta** and **Yugang** for sharing laughs and helping me everytime I needed. And thank you for the green tea!

Aos amigos, as melhores lembranças que esses anos me presentearam

Bárbara Pick (que cuidou e me manteve na linha) **Carina Strano Castellan** (minha gerente de pós-graduação que sempre me aguentou Deus sabe como), **Márcia Borba** (brother, Outbacker de carterinha que sempre ajudou na hora do aperto, e que foram várias), **Mauricio Neves Gomes** (amigo e elegante orientador em IADR), **Breno "Mar**

Doce” Mont’Alverne (o caudilho de Belém), **Érika Pereira** (mulher de sorte), **José Roberto Bauer** (*editor in chief* da Bauermaterials e melhor meio campista com forte chegada na área que já vi jogar desde Tupãzinho) **Marcelo Mendes Pinto** (o bom amigo mais velho), **Flávia Pires Rodrigues** (algo bom pra falar em tempos de tempestade), **Ricardo Sgurza** (que chegou mais tarde mas pegou o jeito rapidinho), **Caroline Miyazaki** (com a Carol todo dia é dia de sol! Até rimou) **Tathy Aparecida Xavier** (essa sim sabe), **Letícia Boaro** (a voz que não vai, e não deve calar) e **Flavia Gonçalves** (the paper machine) e **André Guaraci De Vito** (o homem do CEP). O poeta (eu de novo) sempre disse: quem tem amigo tem tudo. O poeta tem tudo.

Aos amigos longevos, macróbio **Paulo Ferrareze Filho** o que nunca sabe nada e nunca nada. Um brinde de Coca amiga, a desvirada, a Casca, a cidade criança. Sobramos nós. **Bianco Santana**, que só não tem Rosa no nome por uma questão legal. Ao **Giovani Rigoni**, o amigo que a amizade com o Paulo (simples assim) me brindou. O abraço amigo aos que sempre torceram (e rezaram) pelo sucesso desse trabalho.

Ao grande amigo **Flavio Fernando Demarco** pela amizade de longa data pela ajuda especial que me desta para realizar esse trabalho. Mas só faltava ser gremista pra ser guri loco de especial.

Ao professor **Victor Arana-Chavez** e **Tatiana Donato** por terem me proporcionado os primeiros conhecimentos em cultura celular.

Aos professores **Paulo Francisco Cesar**, **Igor Studart Medeiros**, **Roberto Ruggiero Braga**, **Carlos Francci**, **Walter Miranda Jr.**, **Fernando Neves Nogueira** e **Leonardo Eloy Rodrigues Filho** e pelo convívio e pela amizade construída durante os cinco anos dentro de nosso departamento.

A **Rosinha**, a amiga que sempre tornou a minha vida mais fácil. Tu vai pro céu porque tu sim merece!

Ao **Serviço de Documentação Odontológica**, SDO, em especial a **Glauci** pela ajuda oferecida com um sorriso na hora da pressa e da urgência em entregar esse trabalho.

A **Sony**, **Walgreens**, **Ann Arbor Transport Authority** (thank you for riding AATA, please be sure to take your personal itens when exiting the bus), **GameStop**, **Whole Foods**, **Banquet**, **Chili’s** e **Skype** por facilitarem e tornarem a minha vida na simpática Ann Arbor mais feliz e agradável.

A **Renato Portaluppi**, com dois golaços de Portaluppi, Grêmio pra sempre campeão mundial.

Difícil sempre foi ter o controle... positivo e negativo

Hail to the victors!

Rosa V. Engenharia de tecidos com células-tronco de dentes decíduos e *scaffolds* injetáveis e a formação de polpa dental funcional [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

A translação da regeneração pulpar com células tronco para a clinica requerirá o uso de *scaffolds* injetáveis. O objetivo foi estudar o comportamento de células tronco obtidas de dentes decíduos exfoliados (SHED) injetados em canais radiculares de pré-molares humanos com ápice aberto com scaffold de colágeno recombinante humano tipo I (rhC-I) e a base de nanofibras auto-organizáveis (SA). Para determinar a viabilidade e potencial de diferenciação de SHED *in vitro*, raízes não instrumentadas foram posicionadas com o ápice em meio de cultura. SHED ressuspensa em rhC e SA foram injetadas nos canais (n=24, 5×10^5 células/mL). Os controles foram SHED e scaffolds sozinhos. Marcadores para diferenciação odontoblastica (DSPP, DMP-1 e MEPE) foram avaliados semanalmente por RT-PCR por 28 dias. Para avaliar a diferenciação odontoblastica e formação de tecido *in vivo*, SHED transuzida com GFP foram injetadas em canais radiculares (n=8, 10^6 células/mL) utilizando os mesmos grupos e implantadas subcutaneamente em camundongos imunodeprimidos. O controle (C+) foi um pré-molar humano extraído. Análise estatística foi feita com ANOVA ($\alpha=0.05$). Os marcadores de diferenciação odontoblastica aumentaram para SA e rhC-I mas não nos controles. Crescimento de tecido pulpar-símile ($\geq$ do que 60% do comprimento da raiz) foi observado em 75% dos implantes para SA e rhC-I e 0% nos controles. Análise de imunohistoquímica para GFP confirmou a origem tecidual a partir de SHED. PCNA e ensaio de TUNEL mostraram alta atividade proliferativa e poucas células apoptóticas. Injeções de tetraciclina evidenciaram neoformação de dentina. A densidade microvascular e número de odontoblastos delineando a dentina foi similar em rhC-I, SA e C+. A associação de SHED com scaffolds injetáveis foi capaz de originar um tecido pulpar capaz de produzir dentina e constitui um passo a mais frente ao objetivo de regeneração pulpar em pacientes humanos.

Palavras-chave: Engenharia tecidual. Polpa dentária. Matriz extracelular. Células-tronco

Rosa V. Stem cells from exfoliated deciduous teeth and self-assembling nanofiber and recombinant human collagen I scaffolds allows for the engineering of a functional dental pulp [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

The translation of dental pulp regeneration with stem cells to the clinic will require the use of injectable scaffolds. The aim was to study the behavior of stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) injected in the root canal of opened-apex human premolars with either recombinant human collagen I (rhC-I) or self-assembling nanofiber (SA) scaffolds. To assess *in vitro* SHED viability and differentiative potential, non-instrumented roots were set with the apex in culture media. SHED were mixed in rhC-I or SA and injected into canals (n=24, 5×10^5 cells/mL). Controls were SHED or scaffolds alone. Odontoblastic differentiation markers (DSPP, DMP-1 and MEPE) were assessed weekly by RT-PCR for 28 days. To evaluate odontoblast differentiation and tissue formation *in vivo*, SHED transduced with GFP were injected in canals (n=8, 10^6 cells/mL) using same groups and implanted subcutaneously in immunodeficient mice. Positive control (C+) was extracted premolar. Statistic was done with ANOVA ($\alpha=0.05$). Odontoblastic differentiation markers increased in SA and rhC-I but not in controls. Pulp-like tissue growth ($\geq$ than 60% of root length) was observed in 75% of implants for SA and rhC-I and 0% in controls. GFP staining confirmed SHED's tissue origin. PCNA staining and TUNEL assay showed high proliferative activity and few apoptotic cells. Tetracycline injections showed newly formed dentin. Microvessel density and odontoblastic-like cell number lining dentin were similar in rhC-I, SA and C+. Injectable scaffolds and SHED allowed for the engineering of a pulp-like tissue and constitute one step forward towards the goal of dental pulp regeneration in human patients.

Keywords: Tissue engineering. Dental pulp. Extra cellular matrix. Stem cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A PROBLEMÁTICA: O TRATAMENTO DE CANAL DE DENTES JOVENS	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 USO DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS	14
2.2 SCAFFOLDS EM ENGENHARIA DE TECIDOS	18
2.2.1 Peptídeos auto-organizáveis	20
2.2.1.1 O uso de RADA-16 em engenharia de tecidos	25
2.2.2 Scaffold a base de colágeno recombinante humano tipo I	29
2.2.2.1 O uso de rhC-I em engenharia de tecidos	34
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CULTURA CELULAR	39
4.2 PREPARO DOS SCAFFOLDS INJETÁVEIS	39
4.3 VIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO DE SHED EM SCAFFOLDS INJETÁVEIS <i>IN VITRO</i>	41
4.3.1 Proliferação de SHED em scaffold injetáveis	41
4.3.2 Viabilidade celular e diferenciação odontoblástica de SHED dentro de canal radicular de pré-molares humanos extraídos	42
4.4 USO DE SHED E SCAFFOLDS INJETÁVEIS NA OBTENÇÃO DE POLPA DENTAL FUNCIONAL <i>IN VIVO</i>	45
4.4.1 Preparo dos espécimes, implantação, explantação e preparo para análises	45
4.4.2 Análise de características morfológicas	48
4.4.3 Análise imunohistoquímica	49
4.4.4 Detecção de apoptose	51
4.5 Análise estatística	52
5 Resultados	53
5.1 PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ODONTOBLÁSTICA DE SHED EM SCAFFOLD INJETÁVEIS <i>IN VITRO</i>	53
5.2 USO DE SHED E SCAFFOLDS INJETÁVEIS NA OBTENÇÃO DE POLPA DENTAL FUNCIONAL <i>IN VIVO</i>	56
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
Anexo A	94

1 INTRODUÇÃO

1.1- A PROBLEMÁTICA: O TRATAMENTO DE CANAL DE DENTES JOVENS

Traumas na região oral ocorrem frequentemente e são responsáveis por 5% de todas as causas dos tratamentos odontológicos e médicos ⁽¹⁾. Em pré-escolares, as lesões de cabeça perfazem 40% de todas as lesões somáticas ⁽²⁾, sendo que 45% destas são observadas na região oral ⁽¹⁻³⁾. Dentre as lesões dentárias mais frequentes em crianças estão a avulsão e a intrusão dentária, sendo que o índice de necrose pulpar observado nesse tipo de lesão é de 85 a 96% para a primeira e de 70 a 100% para a última ⁽¹⁾. Lesões por trauma em dentes permanentes jovens também são comuns e acometem aproximadamente 30% das crianças ⁽⁴⁾.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 15 milhões de pessoas procuram por tratamento endodôntico todos os anos ⁽⁵⁾. A manutenção da vitalidade pulpar é essencial para a contínua deposição de dentina realizada por esse tecido. Uma vez que esse processo é interrompido, a espessura de dentina na extensão do canal radicular é reduzida, o que resulta em maior fragilidade da estrutura dental ⁽⁶⁾. A interrupção da dentinogênese, tanto nos dentes decíduos quanto nos permanentes jovens, dá origem a características morfológicas que podem complicar a realização de possíveis tratamentos endodônticos, como câmara pulpar volumosa, menor espessura de dentina radicular e formação incompleta da estrutura apical ⁽⁶⁾.

O completo desenvolvimento da estrutura radicular e fechamento do ápice acontecem em até três anos após a erupção dentária ⁽⁷⁾. Durante esse período, quando existe a necessidade de se realizar tratamento endodôntico, a presença de paredes finas e frágeis aliada ao diâmetro do forame apical, em geral maior do que o diâmetro do próprio canal radicular, dificultam o estabelecimento do batente apical e aumentam o risco de fratura durante a instrumentação mecânica do canal ⁽⁸⁾.

O tratamento endodôntico dos dentes jovens com rizogênese incompleta depende da condição de vitalidade pulpar e pode ser realizado por duas vertentes: apicogênese ou a apicificação ⁽⁹⁾.

A apicogênese é a terapia indicada em dentes com rizogênese incompleta e com polpa viável e tem como objetivo o fechamento normal do ápice por meio do desenvolvimento regular das paredes radiculares apicais ⁽⁸⁾. Esse tratamento consiste na remoção da porção de polpa inflamada e aplicação de hidróxido de cálcio sobre o tecido remanescente ^(9, 10). O hidróxido de cálcio fornece ao remanescente pulpar um pH alcalino e sua presença física dentro do canal apresenta um potente efeito antibacteriano, inibindo a atividade osteoclástica e prevenindo a entrada de exudato e tecido de granulação ⁽¹¹⁾. Essa abordagem leva a sustentação da viabilidade da bainha de Hertwig, permitindo o desenvolvimento radicular no sentido corono-radicular ⁽¹²⁾.

Já a apicificação visa o selamento biológico do ápice radicular e é indicada quando a polpa não possui mais vitalidade. É realizada através da criação de um meio alcalino no interior do sistema de canais radiculares, que propicia a formação de uma barreira apical de tecido mineralizado ⁽¹³⁾.

Embora essas terapias sejam largamente utilizadas na prática clínica, o prognóstico a longo termo dos dentes sujeitos a esses tipos de tratamentos é difícil de determinar, já que é impossível prever o aumento do comprimento radicular do dente bem como reduzir o diâmetro do canal radicular ^(6, 8).

Empregar a engenharia de tecidos para a obtenção de uma polpa dental que permita a completa a formação dos tecidos e anexos radiculares (Figura 1.1) é uma estratégia que tem sido aventada. Recentes estudos mostraram ser possível obter tecido pulpar funcional *in vivo* a partir de células-tronco na polpa de dentes decíduo esfoliados ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Embora os elegantes resultados obtidos atestem o potencial da engenharia de tecidos em Endodontia, o uso de disco de dentina de 1 mm de espessura e *scaffolds* rígidos que exigem uso de clorofórmio para sua manufatura consistem em fatores limitantes para a extrapolação de conclusões de que essa estratégia é clinicamente viável. A

translação da conhecimento obtido com a pesquisa com célula-tronco para a terapêutica endodôntica exige compreender o potencial e comportamento das SHED em estruturas radiculares completas e o desenvolvimento de técnicas que permitam a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos na prática clínica.

Figura 1.1 – Esquema utilizado para obtenção de polpa dental por engenharia de tecidos para permitir a formação vertical e lateral completa da raiz em dente jovem com polpa necrótica induzida por trauma ⁽⁶⁾.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- USO DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS

O uso de materiais restauradores sintéticos para substituir estruturas dentais e funções perdidas é uma prática quase tão antiga quanto a própria Odontologia ⁽¹⁷⁾. A engenharia de tecidos é uma promissora área, cujo principal objetivo é o desenvolvimento de estratégias e material capazes de repor os tecidos danificados ou perdidos por materiais biológicos, pela integração de princípios, métodos e conhecimentos dos campos da química, física, engenharia e biologia ⁽¹⁸⁾. Entre os diversos avanços obtidos pela engenharia de tecidos e que se traduziram em opções de tratamento estão: a produção de pele para indivíduos com queimaduras ⁽¹⁹⁾, a obtenção de osso para indivíduos com perdas ósseas ⁽²⁰⁾, o desenvolvimento de vasos sangüíneos ⁽²¹⁾ e a produção de cartilagem para reconstruções faciais ⁽²²⁾. Na Odontologia, as conquistas não são menos promissoras e importantes estudos contribuem para o desenvolvimento de estratégias que visem a regeneração da articulação têmporo-mandibular ⁽²³⁾, de ligamento periodontal ⁽²⁴⁻²⁶⁾, dentina ^(14, 27-30), esmalte ⁽³¹⁻³⁴⁾, polpa ^(5, 14, 15, 18, 35, 36), bem como de estruturas dentais complexas ^(26, 37-41).

Foi no final dos anos 80 que o químico de polímeros Robert Langer e o cirurgião Joseph Vacanti acreditaram ser possível desenvolver um tecido ou órgão a partir de células semeadas em uma matriz extracelular biodegradável (*scaffold*) ⁽⁴²⁾. Tornar real o potencial de tratamentos regenerativos por meio desse método implica a integração de três requisitos: células-tronco (*stem cell*), o *scaffold* e sinais morfogenéticos indutivos ⁽⁴³⁾.

A pesquisa com células-tronco abre uma vasta janela para o desenvolvimento de novas terapias. Conceitualmente, células-tronco são células capazes de se auto-renovarem e dar início à progênie diferenciada ⁽⁴⁴⁾.

As mais primitivas das células-tronco são as células-tronco totipotentes (Figura 2.1) ⁽⁴⁵⁾. Embora essas células possam o potencial de desenvolverem o embrião completo, se diferenciarem em qualquer tipo de célula (incluindo membranas embrionárias, cordão umbilical e placenta), essa característica é evanescente e persiste somente pelas primeiras 72 horas de desenvolvimento embrionário, desde a fecundação do óvulo até que o estágio de embrião de 8 células ⁽⁴⁵⁾. Com as divisões subseqüentes as células-tronco embrionárias perdem a habilidade de darem origem a um organismo inteiro, entretanto são capazes de diferenciarem-se em células presentes nos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), sendo assim consideradas pluripotentes. Com as divisões posteriores, as células se tornam mais e mais restritas em suas habilidades de se diferenciarem em múltiplas linhagens ⁽⁴⁵⁾. Com as divisões ulteriores, a habilidade de diferenciar-se em múltiplas linhagem diminui ainda mais e as células tornam-se multipotentes, isto é, capazes de formar um número limitado de tipos celulares. Esta é a propriedade conferida as células-tronco adultas, também chamadas de células tronco somáticas ou não-embrionárias. Estas células são responsáveis pela renovação normal dos tecidos e pela regeneração após traumas ⁽⁴⁶⁾. Pensava-se que somente as células embrionárias eram capazes de dar origem a diversos tipos celulares enquanto células-tronco adultas eram restritas a se diferenciarem e regenerarem apenas os tecidos nos quais elas residiam ⁽⁴⁷⁾. Entretanto, esta visão mudou ao se descobrir que células-tronco encontradas no estroma de medula óssea (*Bone Marrow Stromal Cells* – BMSC) são capazes de se diferenciar células musculares esqueléticas, condrócitos, osteoblastos, adipócitos entre outros ⁽⁴⁸⁾. Este achado consiste em um importante avanço no que tange o estudo envolvendo células-tronco, uma vez que o uso de estas quando de origem embrionárias é cercado de celeumas éticos e religiosos ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

Figura 2.1 – Estádios de formação das células-tronco e algumas de suas possíveis aplicações

A Odontologia se valeu da metodologia empregada para isolar e caracterizar BMSC para isolar células clonogênicas e altamente proliferativas a

partir da polpa dental ⁽⁵²⁾. Esse tipo de célula possui capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar em múltiplas linhagens ⁽⁵³⁾, características estas que elevaram seu status ao de célula-tronco de polpa dental (*Dental Pulp Stem Cell* – DPSC) ⁽⁵³⁾. Análogas às BMSC, as DPSC expressam marcadores ósseos como sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾, entretanto possuem maior eficiência na proliferação celular e formação de colônias ⁽⁵²⁾. As DPSC são capazes de regenerar o complexo dentino-pulpar uma vez que são capazes de formar dentina ectópica associada a tecido pulpar após o transplante *in vivo* ⁽⁵⁷⁾.

O mesmo grupo de pesquisadores responsável pelo descobrimento da DPSC também foi responsável pela identificação e isolamento de células-tronco na polpa de dentes decíduo esfoliados (*Stem Cell from Human Exfoliated Primary Teeth* – SHED) em 2003 ⁽³⁶⁾. Este processo se inicia com a digestão da polpa de dentes decíduos com collagenase e dispase e as suspensões de células não-aglomeradas são cultivadas em superfícies *low-attachment*. A partir de cada dente decíduo são obtidas de 12 a 20 células capazes de formar colônias, uma característica encontrada em outras populações de célula-tronco. Após serem separadas da forma de aglomerado esférico, as células são capazes de proliferar individualmente ⁽⁵²⁾.

SHED *ex vivo* expandidas expressam STRO-1 e CD146, marcadores também encontrados em células-tronco de medula óssea (*Bone Marrow Stromal Stem Cell* – BMSSC) e DPSC ⁽³⁶⁾. Esses dois marcadores foram localizados ao redor de vasos sanguíneos das polpa originária, o que sugere que as SHED tem sua origem em nichos perivasculares ⁽³⁶⁾. Ademais, marcadores relacionados a células estromais e vasculares, como fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase* – ALP), matriz extracelular fosfoglicoprotéica não-colagênica (*Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein* – MEPE), fator de crescimento de fibroblastos básico (*Basic Fibroblast Growth Factor* – FGFb) e endostatina foram identificados em SHED ⁽³⁶⁾.

Altamente proliferativas, essas células clonogênicas são capazes de se diferenciar em uma grande variedade de células, incluindo odontoblastos, adipócitos, células neuronais e endoteliais ^(14, 53).

Os dentes decíduos são significativamente diferentes dos permanentes considerando seu processo de desenvolvimento, estrutura tecidual e funções. Sendo assim, é compreensível que SHED possua maior taxa de proliferação, formação de *clusters* e capacidade osteoindutiva *in vivo* comparada a DPSC ⁽³⁶⁾. Aparentemente SHED representam uma população de células-tronco multipotente mais imatura do que as populações de células-tronco pós natais já examinadas ⁽³⁶⁾. A habilidade que a SHED possui de cruzar a fronteira de sua linhagem permite especular que células-tronco derivadas de tecidos dentais podem ser utilizadas em terapias em diversos outros tecidos.

2.2 SCAFFOLDS EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Os *scaffolds* são projetados para providenciar um espaço tridimensional onde as células transplantadas ou infiltradas permaneçam ligadas, com capacidade de proliferação e diferenciação para produzir o tecido desejado ⁽⁵⁸⁾. Podem ser obtidos a partir de material cerâmico ^(59, 60) ou polimérico ^(38, 61) ou da associação destes ^(62, 63). Entre os poliméricos naturais que têm sido largamente utilizados em engenharia de tecidos, pode-se citar os a base de colágeno tipo I ⁽⁵⁸⁾, quitosana ⁽⁶⁴⁾ e ácido hialurônico ⁽⁶⁵⁾. Já entre os sintéticos cita-se os poli-anidridos ⁽⁶⁶⁾, poli-epsilon-caprolactanos (PCL) ⁽⁶⁷⁾, ácidos poli-glicólicos (PGA) ⁽⁶⁷⁾ e ácidos poli-láctico co-glicólicos (PLGA).

A indicação do tipo de material a ser utilizado como suporte para as células depende do objetivo específico da matriz, das propriedades físicas (reologia, resistência mecânica, porosidade, rugosidade) e químicas (velocidade e modo de degradação) desejadas, assim como da capacidade de devolução de drogas/fatores, entre outros. A inobservância destes e outros requisitos (Quadro

2.1) na escolha do material para construção do *scaffold* pode comprometer o resultado esperado.

As propriedades físicas da matriz devem atender às necessidades as quais ela estará sujeita. O *scaffold* deve possuir resistência mecânica compatível com o tecido circundante, suficiente para suportar tensões *in vivo* e para proteger as células de pressões elevadas ⁽⁶⁸⁾. O grau de porosidade e a extensão da superfície específica do *scaffold* favorecem a permeabilidade e homogeneidade de grandes quantidades de solução no interior da matriz, o que é de grande importância para a geração de novos tecidos ⁽⁶⁸⁾. A presença de macroporos em uma matriz facilita o crescimento de tecido, entretanto resulta na diminuição da tenacidade e da resistência à fratura, o que pode comprometer o desempenho *in vivo*.

As matrizes empregadas devem ser biocompatíveis (permitir a mútua existência entre o material e o ambiente fisiológico, de tal forma que um não produza efeitos indesejáveis ao outro) e biodegradáveis (prover espaço para deposição de novo tecido ⁽⁶⁹⁾ e permitindo sua formação ao redor de cada célula ou aglomerado celular em uma estrutura tecidual interconectada ⁽⁶¹⁾). Outro predicado desejável é a capacidade de liberar substâncias que promovam a quimiotaxia e estimulem a proliferação e diferenciação celular como proteína morfogenética do osso (*Bone Morphogenetic Protein* – BMP) e fatores de crescimento. A taxa de liberação dos fatores de crescimento pode afetar profundamente a quantidade, qualidade e a velocidade dos tecidos formados.

Diversos biopolímeros, como o poli-L ácido láctico (PLLA), ácidos poliglicólicos (PGA), ácidos poli-láctico co-glicólicos (PLGA), copolímeros de PLLA-PLGA e outros biomateriais como alginato, agarose e géis de colágeno têm sido desenvolvidos para a cultura de células em ambiente tridimensional ^(58, 70-72). Esses sistemas de cultura celular tem prestado grande serviço na compreensão da interação entre células e material fomentando o avanço do campo da engenharia de tecidos. Entretanto, esses biomateriais são freqüentemente compostos de nanofibras com diâmetro variando de 10 a 100 µm, o que confere uma grande diferença em tamanho, superfície, porosidade e concentrações em

relação as matrizes extra-celulares (*Extracellular Matrix* – ECM) naturalmente encontradas no corpo humano.

Quadro 2.1 – Características de um *scaffold* ideal ^(73, 74)

-
- Unidades básicas devem ser flexíveis para atender o design desejado
 - Apresentar taxa de degradação controlável
 - Não ser citotóxico
 - Promover interações entre células, substrato e tecido hospedeiro
 - Não causar resposta imune ou inflamatória
 - Obtenção, purificação e processamento viáveis economicamente
 - Ser facilmente armazenável e transportável
 - Ser quimicamente compatível com soluções aquosas e condições fisiológicas
 - Integrar com outro material e com o próprio corpo
-

2.2.1 Peptídeos auto-organizáveis

A auto-associação molecular, por definição, é a organização espontânea de moléculas sem instruções externas sob condições de equilíbrio termodinâmico em uma estrutura definida devido a interações de origem não-covalente ⁽⁷⁵⁾.

As forças que governam a auto-conformação dos peptídeos em água tem suas origens em três grandes fornecedores de energia: interações hidrofóbicas dos terminais álcalis, pontes de hidrogênio entre os segmentos intermediários dos peptídeos e repulsão eletrostática entre aminoácidos carregados eletricamente ⁽⁷⁶⁾. As primeiras duas são forças de atração e tendem a promover a agregação das moléculas de peptídeos enquanto a última favorece a dissociação. As conformações finais, incluindo tamanho, forma e curvatura interfacial, refletem o delicado balanço entre cada uma dessas energias. Em água, moléculas individuais de peptídeos são esperadas a assumir uma forma afilada devido a presença das terminações álcalis hidrofóbicas e a hidratação

dos grupos carregados eletricamente. Embora as simulações mostrem que estruturas afiladas prefiram se conformar de maneira esférica, o que aumenta a efetividade de empacotamento ⁽⁷⁷⁾.

O nível de empacotamento dentro das nanofibras de peptídeos determina as características morfológicas e estruturais bem como as propriedades funcionais, incluindo resistência a degradação, densidade de empacotamento e ordem de epítomos presentes nas superfícies. Como resultado, o grau de empacotamento das nanofibras de peptídeos podem afetar a dinâmica molecular e a biocompatibilidade dessas estruturas ⁽⁷⁶⁾.

A primeira molécula da classe de peptídeos auto-organizáveis foi identificada em leveduras como um dos segmentos da proteína zaetina ⁽⁷⁸⁾. O peptídeo EAK16-II é formada por alanina (A), ácido glutâmico (E) e lisina (K) ligados em uma sequência composta de 16 aminoácidos (AEAEAKAKAEAEAKAK).

O EAK16-II é caracterizado pela repetição periódica de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que originam espontaneamente uma estrutura tipo β -sheet isoflutuante em soluções aquosas ⁽⁷⁹⁾. Devido ao arranjo espacial, todos os aminoácidos carregados eletricamente se situam no mesmo lado da molécula (Figura 2.2). Assim, possuem padrões complementares com dois pares de grupos iônicos carregados positiva e negativamente ⁽⁷⁹⁾.

Figura 2.2 – Molécula do peptídeo auto-organizável EAK16-II

Quando expostas a soluções aquosas com pH neutro, os íons procuram pelos resíduos dos peptídeos carregados eletricamente e as alaninas (porção apolar das superfícies do β -sheet) de diferentes β -sheet se juntam como resultado das suas interações hidrofóbicas em água fazendo com que os

peptídeos se auto-organizem de tal maneira que as cargas positivas e negativas se liguem por interações intermoleculares iônicas alternadamente como em um tabuleiro de xadrez (Figura 2.3) ⁽⁷³⁾. Com isso são obtidas duplas camadas de nanofibras de β -*sheet*, estrutura semelhante às encontradas em fibras de seda e teias de aranha ⁽⁷³⁾. Em geral, esta estrutura β -*sheet* se mantém estável dentro de uma faixa de pH e temperatura¹, altas concentrações de agentes desnaturantes, uréia e hidrocloreto de guanidina ⁽⁷³⁾.

Figura 2.2 – Micrografias de força atômica mostrando a conformação das nanofibras obtidas em um *scaffold* de peptídeo composto por quatro aminoácidos e um grupo álcali ⁽⁸⁰⁾

O EAK16 foi sistematicamente alterado para dar origem a um outro peptídeo, o RADA-16 (Figura 2.3), no qual as argininas positivamente carregadas foram substituídas por lisinas e os ácidos aspárticos negativamente carregados substituídos por ácidos glutâmicos, originando assim um peptídeo com sequências repetidas de arginina (R), alanina (A), aspartato (D) e alanina (A) (RADARADARADARADA) ⁽⁷³⁾.

O RADA-16 é um peptídeo sintético composto por 16 amino ácidos similar ao EAK16 e por mais de 99% de água ⁽⁷³⁾. A natureza anfipática do RADA-16 dá origem a uma organização espontânea tridimensional de seus peptídeos em nanofibras na presença de cátions monovalentes ^(79, 81) seja por meio da adição de solução salina, de meio para cultura celular ou de injeção do material in vivo

¹ A faixa não são especificadas pelo artigo ⁽⁷³⁾. O peptídeo é estável a temperatura ambiente e pode ser armazenado a 4 °C.

⁽⁷⁹⁾. O tamanho físico relativo a células e proteínas, a característica anfipática do peptídeo e a habilidade de manter uma estrutura aquosa mimetizam características encontradas em ECM naturais ⁽⁸²⁾.

As nanofibras possuem aproximadamente 10 nm de diâmetro, em uma escala similar à encontrada em ECM *in vivo*. A densidade das nanofibras e tamanho médio de poros (5 a 200 nm) são dependentes da concentração da solução de peptídeos utilizada para obter o *scaffold*, podendo variar de 0,1 a 3% (1 a 30 mg/mL) ⁽⁷³⁾.

Diversos estudos foram realizados com RADA-16 de acordo com procedimentos padronizados pela *International Organization for Standardization* (ISO) para avaliar a biocompatibilidade, toxicidade e segurança do material *in vitro* e em modelos animais.

O teste de difusão em agar ⁽⁸³⁾, mensura o efeito do material em células em cultura, as quais são extremamente sensíveis a pequenas quantidades de agentes químicos lixiviados, mostrou que o RADA-16 não apresenta efeito citotóxico quando testado em cultura celular de fibroblastos L929 de camundongos ⁽⁸²⁾. Os resultados obtidos no teste de hemólise ⁽⁸⁴⁾, onde o grau de hemólise é mensurado espectrofotometricamente, realizado com o contato direto do material com sangue de coelho mostrou que o material não possui potencial hemolítico ⁽⁸²⁾. Ademais, o tempo de atividade de protrombina ⁽⁸⁴⁾, medida mostrou que o RADA-16 não possui efeito adverso no tempo de coagulação de plasma humano ⁽⁸²⁾.

Figura 2.3 – Representação esquemática de um peptídeo de RADA-16 e o arranjo obtido com a auto-organização. As cargas negativas e positivas são representadas em azul e vermelho, respectivamente ⁽⁷³⁾

Os testes realizados *in vivo* mostraram resultados igualmente promissores. Para avaliar a distribuição local e sistêmica, além da absorção, degradação, metabolismo e excreção (*Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion* – ADME) do material uma versão de RADA-16 10% marcada com ^{14}C foi implantada em defeitos ósseos criados no fêmur de ratos. Os resultados para ADME foram satisfatórios uma vez que após 14 dias não houve acúmulo problemático em nenhum órgão e a solução de RADA-16 marcada com carbono-14 foi sendo eliminada ao redor dos últimos dias do experimento. A implantação intracutânea ⁽⁸³⁾ resultou em um Índice de Irritação Primária igual a 0 (desprezível) depois 72 horas, e nenhuma reação febril foi observada no local nas primeiras 24 horas após a injeção ⁽⁸²⁾. Testes realizados em cabras e coelhos para avaliar o potencial inflamatório do material mostrou que depois não são observados sinais de inflamação ou de resposta imune quando o material foi injetado intra-muscularmente por 14 dias ⁽⁷⁴⁾.

2.2.1.1 O uso de RADA-16 em engenharia de tecidos

A RADA-16 foi lançado comercialmente em novembro de 2004 pela 3DM Inc (Cambridge, MA, EUA). À época, o desenvolvimento do *scaffold* recebeu o prêmio anual de *Excellence in Technology Award* oferecido pela *Frost & Sullivan*, uma importante empresa de pesquisa de tecnologias de mercado. Seus principais desenvolvedores, Dr. Carlos Semino e Dr. Shuguang Zhang ainda receberam o *Paul H. Fraisse Prize for Outstanding Scientific Contribution* e *Fellow from the Japanese Society for the Promotion of Science* e o *R&D 100 Awards*, considerado o “Oscar da Inovação”, respectivamente. Tamanho frenesi se justifica pela possibilidade de se contar com produto de custo acessível, pronto para o uso, capaz de promover um espaço tridimensional para crescimento celular *in vitro* e *in vivo* além de polimerizar instantaneamente em condições fisiológicas.

Essa nova classe de *scaffolds* a base de peptídeos auto-organizáveis tem se tornado importante não só pelos estudos sobre o comportamento espacial das células, mas principalmente pela oportunidade de desenvolver inovadoras estratégias para regeneração tecidual.

Uma das primeiras grandes inovações deu-se em cima dos sistemas de cultura celular evoluindo do padrão bidimensional (2D) para cultura em três dimensões (3D). Os fenômenos de transporte são dramaticamente diferentes nesses dois sistemas. Em sistemas de cultura 2D, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento difundem-se rapidamente em direção a superfície de cultura, um grande contraste em relação ao ambiente *in vivo* onde os gradientes de difusão modulam a transmissão desses compostos ⁽⁷³⁾. Um notório estudo de 2006 forneceu as primeiras evidências de que as matrizes nas quais células-tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC) são cultivadas podem especificar a linhagem obtida ⁽⁸⁵⁾. Nesse estudo, variações na rigidez da matriz levaram as MSC a se diferenciarem em neurônios, mioblastos e osteoblastos.

Com isso ficou evidente a importância das propriedades dos microambientes e esse trabalho ainda manifesta intrigantes possibilidades que o sistema de cultura 3D oferece ⁽⁸⁵⁾.

Partindo desse pressuposto, pesquisas começaram a explorar o potencial de cultivo celular tridimensional *in vitro*. Um estudo que avaliou por 4 semanas a capacidade de MSC bovinas em se diferenciarem em condrócitos quando inseridas em RADA-16 ⁽⁸⁶⁾ Ao final do período foi possível observar no interior do *scaffold* a ocorrência de um fenótipo funcional compatível com atividade de condrogênica evidenciada pelo aumento da concentração de glicosaminoglicanos sulfatados e colágeno tipo II. A quantidade de condroblastos viáveis em RADA-16 foi 4 vezes superior ao obtido em agarose, sistema bastante utilizado para cultura de condrócitos. O acúmulo tempo-dependente da matriz cartilaginosa acarretou em aumento da rigidez do *scaffold* indicando a deposição de um tecido mecanicamente funcional. ⁽⁸⁶⁾.

O uso de RADA-16 também foi investigado para aprimorar o protocolo de cultura de células ciliadas de cóclea de aves ⁽⁸⁷⁾. Os resultados obtidos com esse *scaffold*, comparados aos outros 6 grupos experimentais², mostraram a maior densidade celular após 48 horas de cultivo e a mais baixa densidade de células mortas depois de 72 horas. No final de 3 dias, 60% das células viáveis foram positivas para FM1-43, um conjugado fluorescente capaz de se ligar a estereocílios funcionais. Segundo o estudo, experimentos que requerem células ciliadas funcionais em até 3 dias pode se beneficiar do protocolo de cultura utilizando RADA-16 ⁽⁸⁷⁾.

In vitro já foi demonstrado que o RADA-16 é capaz de sustentar o crescimento de neurônios de cultura primária e propiciar um ambiente favorável para a ocorrência de sinapses ⁽⁷⁴⁾. A relação entre esse *scaffold* e células tronco neuronais fetais humanas (*Human Fetal Neural Stem Cell* – hNSC) também é positiva. As hNSC se caracterizam por serem altamente proliferativas capazes de se diferenciarem em diversos tipo de células ⁽⁸⁸⁾. Associadas ao RADA-16,

² Demais grupos do estudo: lâmina de vidro, colágeno bovino tipo I, colágeno bovino tipo I + sulfato de condroitina, Matrigel e controles para ouvido e tegumento

hNSC é capaz de migrar por entre a estrutura do *scaffold* e diferenciar-se em neurônios e células gliais (Figura 2.4) ⁽⁸⁸⁾.

Figura 2.4 – hNSC diferenciadas em neurônios e células gliais sem scaffold (A) e com uso de RAD-16 (B) (azul: DAPI; vermelho: GFAP; verde: Tuj1) ⁽⁸⁸⁾

Estudos *in vivo* mostram que diversas áreas biomédicas podem se beneficiar com o desenvolvimento de terapias utilizando do RADA-16 ⁽⁸⁹⁻⁹³⁾.

A principal causa de falência cardíaca é a perda do miocárdio resultante de enfarto e o potencial limitado de regeneração de cardiomiócitos em mamíferos ⁽⁹³⁾. Embora sucessos consideráveis foram obtidos na obtenção de artérias artificiais ^(94, 95) a obtenção de microvasculaturas funcionais ainda consiste num dos maiores desafios da engenharia de tecidos ⁽⁹⁶⁾ uma vez que a maioria dos *scaffolds* empregados para suportar o crescimento celular são incapazes de promover formação de capilares e integrá-los com os tecidos circundantes ⁽⁹⁷⁾.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2002, no mundo inteiro, as mortes relacionadas a isquemias no coração perfizeram um total de 12,6% ⁽⁹⁸⁾. Estratégias utilizando transplante celular (implante de células muscular esqueléticas, de medula óssea e mioblastos) e engenharia de tecidos cardíacos emergem como possíveis tratamentos para restabelecer funções cardíacas e melhor a revascularização de áreas cardíacas isquêmicas ^(99, 100). A aplicação dos princípios da engenharia de tecidos usando o *scaffold* RADA-16 mostrou

que é possível criar um microambiente de nanofibras tão logo que o *scaffold* é injetado no miocárdio de camundongos ⁽⁹³⁾. Esse microambiente é capaz de recrutar células musculares lisas vasculares que dão origem a estruturas vasculares funcionais (Figura 2.5). Quando cardiomiócitos positivos para proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* – GFP) foi injetado com RADA-16, as células foram capazes de sobreviver e aumentar o número de células endoteliais e musculares lisas vasculares endógenas recrutadas ⁽⁹³⁾.

Combinando biotina³ com RADA-16 foi possível desenvolver um interessante sistema para devolução controlada de medicamentos e promover a liberação lenta e controlada de fator do crescimento do tipo insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1* – IGF-1) no miocárdio infartado de ratos ⁽¹⁰¹⁾. A versão biotinilada do peptídeo permitiu o ligação ao IGF-1 e não interferiu na auto-organização do *scaffold* em nanofibras dentro do miocárdio ⁽¹⁰¹⁾. O transplante de cardiomiócitos utilizando essa versão biotinilada foi capaz de melhorar significativamente as funções sistólicas dos animais após um experimento de infartação miocárdica ⁽¹⁰¹⁾.

Figura 2.5 – Células musculares lisas vasculares dentro da estrutura criada pelo RAD-16 são capazes de formar *in vivo* vasos maduros após 14 dias (a) e arteríolas após 28 dias (b). (vermelho: anticorpo para actina de músculo lisa; azul: DAPI; barra equivalente a 10 μ m) ⁽⁹³⁾

³ A biotina é também conhecida como vitamina H, vitamina B₇ ou vitamina B₈

Embora ainda não exista maneira de se controlar no RADA-16 importantes características como direcionalidade e alinhamento das nanofibras e tamanho e distribuição das porosidades ⁽⁷³⁾, os resultados apresentados mostram que essa classe de peptídeos bioreabsorvíveis possui um grande potencial no campo da engenharia de tecidos.

2.2.2- Scaffold a base de colágeno recombinante humano tipo I

O colágeno é o maior componente da ECM, provendo suporte a tecidos como pele, cartilagens, osso, vasos sanguíneos e ligamentos além desempenhar funções fundamentais no estabelecimento e manutenção da estrutura dos tecidos humanos e de interagir com células e modular atividades biológicas ^(102, 103).

As moléculas formadoras de fibrilas de colágeno consistem em três cadeias polipeptídicas de glicina-X-Y (Gly-X-Y) onde a cadeia de aminoácidos se organiza em uma trança para formar uma tripla-hélice ⁽¹⁰⁴⁾. Vinte e sete tipos de colágeno foram identificados por purificação protéica, cDNA e *screening* de DNA ⁽¹⁰⁵⁾.

O processo de síntese do colágeno (Figura 2.6) inicia com a sintetização de grandes moléculas precursoras conhecidas como pró-colágenos. Uma etapa crítica na organização e estabilidade térmica dos pró-colágenos diz respeito a hidroxilação de resíduos de prolina pela prolil-4-hidroxilase na posição Y da Gly-X-Y dando origem a 4-hidroxiprolina (PH4) ⁽¹⁰⁶⁾. Ao mesmo tempo por ação da enzima lisil-oxidase, resíduos de lisina são seletivamente hidroxilados em hidroxilisina que podem então ser glicosilados pela adição de glicose-galactose ⁽¹⁰⁷⁾. No caso do colágeno tipo I, após cada cadeia ter recebido cerca de 100 resíduos de 4-hidroxiprolina, a conformação triplo-helicoidal propaga da porção carboxi (C)-terminal para amino (N)-teminal. Após a secreção do pró-colágeno

na matriz extra-celular ambos C- e N-propeptídeos são clivados e as moléculas se auto-arranjam em fibrilas ⁽¹⁰⁸⁾. O processo de *cross-linking* das fibrilas na matriz extra-celular é medida pela enzima lisil oxidase ⁽¹⁰⁹⁾. Essa enzima converte resíduos de hidroxilisina em derivados de aldeído, alisina e hidroxialisina, os quais reagem com os resíduos de lisina, hidroxilisina e histidina para formar *crosslinking* intermolecular ⁽¹¹⁰⁾.

Há muito o colágeno é utilizado em aplicações biomédicas como aumento de volume de tecidos moles, hemostáticos, fio de sutura, matrizes para acelerar cicatrização, gel para devolução de drogas entre outros ⁽¹⁰³⁾. O colágeno disponível como biomaterial é derivado de tecidos animais e contém principalmente colágeno tipo I e uma pequena quantidade de tipo III. O colágeno de fonte animal apresenta algumas desvantagens que limitam sua aplicabilidade. A razão entre os diferentes tipos de colágenos e o grau de *crosslinking*, por exemplo, varia de acordo com as condições fisiológicas e idade do animal do qual foi obtido. Isso pode levar a variabilidade entre lotes e inconsistências nas propriedades físicas e químicas do material ⁽¹⁰⁵⁾.

Outro revés que deve ser levado em consideração é a segurança uma vez que colágeno derivado de tecido animal possui potencial para contaminação viral e transmissão de príons ⁽¹¹¹⁾. Atualmente é possível obter colágeno humano altamente purificado derivado de sistemas de produção baseados em DNA recombinante ^(112, 113). Por meio de fermentação em um processo que não requer componentes derivados de animais, diversas versões de colágeno fibriforme humano, no qual a arquitetura dos tecidos humanos é baseada, têm sido produzidas ⁽¹⁰⁵⁾. As vantagens desse tipo de colágeno comparada aos derivados de animais são apresentadas na Quadro 2.1.

Figura 2.6 – Biossíntese do colágeno ⁽¹¹⁴⁾

A expressão e acúmulo em diversos sistemas recombinantes eucarióticos de colágeno humano com correta conformação triplo-helicoidal, resistente a desnaturação térmica e capaz de manter a sua estrutura à temperatura corpórea é viável pela co-expressão de colágeno com P4H humano ativo (sistema multigênico) ⁽¹⁰⁵⁾.

O acúmulo de colágeno recombinante foi relatado em sistemas biorreatores eucarióticos (ex. cultura de células de mamíferos ^(115, 116), de insetos ^(117, 118) e de leveduras ^(119, 120)) bem como em sistemas de produção transgênicos (bicho da seda ⁽¹²¹⁾, cultura de células de tabaco ⁽¹²²⁾ e plantas de tabaco ^(123, 124)). Embora o acúmulo de colágeno nesses sistemas tenha sido comprovado, somente as células de mamíferos transinfectadas com P4H são capazes de apresentar cadeias de colágeno completamente hidroxiladas.

O colágeno obtido nos outros sistemas de expressão sem a coexpressão de P4H não possui hidroxilação de prolina ou esta se apresenta sub-hidroxilada. O resultado é a produção de um colágeno instável, suscetível à degradação proteolítica e incapaz de auto-organizar-se em fibrilas, de utilidade nula para os objetivos da engenharia de tecidos ⁽¹⁰⁵⁾.

A *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica⁴ que combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em alta quantidade, fácil aumento de escala produtiva e meios de crescimento) e de eucariotos (capacidade de realizar modificações pós-transducionais) ⁽¹²⁵⁾. O acúmulo em quantidades comercialmente viáveis de diversos tipos de colágeno nessa levedura ^(120, 126) fazem da *P. pastoris* o sistema eletivo para a produzir de colágeno recombinante. Essa tecnologia se baseia na co-expressão de P4H humano ativo e o acúmulo de pró-colágeno humano no interior do retículo endoplasmático da *P. pastoris*. A alta quantidade de colágeno adequadamente organizado (> 1 g/L) aliada com a possibilidade de cultivar *P. pastoris* em grandes densidades celulares (> 500 g/L) provêm a base da eficiência necessária para a produção em escala comercial de colágeno recombinante ⁽¹⁰⁵⁾.

⁴ Leveduras metilotróficas possuem a capacidade de metabolizar o metanol como fonte de carbono

Quadro 2.1 – Parâmetros comparativos do colágeno de origem animal e recombinante

Parâmetro	Colágeno animal	Colágeno recombinante
Fonte	colágeno extraído de carcaças e tecidos animais ⁽¹²⁷⁾	produzido em sistemas geneticamente modificados ⁽¹¹³⁾
Segurança	risco de contaminação com príons e vírus ⁽¹²⁸⁾ , difícil identificação da origem	sem risco de contaminação com príons e vírus ⁵ , caracterizado com fonte identificável ⁽¹¹²⁾
Previsibilidade	variação entre lotes com mistura heterogênea de colágeno tipo I e III ⁽¹²⁹⁾	composição consistente e reproduzível ⁶
Estrutura	colágeno multimérico tipo I e III com grau de crosslinking dependente da idade do animal, gelatina de difícil purificação ⁽¹³⁰⁾	colágeno na sua maioria monomérico ou fragmento de cadeia simples homogênea e pré-definida de onde a gelatina pode ser purificada ⁽¹³¹⁾
Recuperação do produto	complexa e com resultados variáveis	reproduzível por clivagem celular com bioprocessadores
Propriedade intelectual	limitada	composição, formulação e processamento registrável
Customização	limitada	conformação e composição específicas definíveis para atender as aplicações de interesse ^(132, 133)

A expressão de pró-colágeno recombinante nesse sistema é controlado pela enzima álcool oxidase. Assim a alimentação com metanol induz a produção do pró-colágeno e sustenta o crescimento em um sistema fermentador de cultivo descontinuo alimentado (*batch* alimentado ou *fed-batch*) ⁽¹⁰⁵⁾ onde a adição controlada de nutrientes a um reator com alta densidade celular afeta diretamente a taxa de crescimento da cultura e evita a limitação de oxigênio e formação de metabólitos secundários e ⁽¹³⁴⁾.

O pró-colágeno não é secretado no meio extracelular e sim acumulado intracelularmente necessitando ser extraído das células e convertido na

⁵ Não foram encontradas referências na literatura consultada que endossem essa informação

⁶ Não foram encontradas referências na literatura consultada que endossem essa informação

estrutura triplo-helicoidal com o uso de proteases ⁽¹⁰⁵⁾. Após maximizar o acúmulo de pró-colágeno e a densidade celular no fermentador, o material do fermentador é coletado, as células são lavadas e então lisadas por ruptura física ⁽¹⁰⁵⁾. A pepsina tem sido usada como tratamento para as células de levedura para converter o pró-colágeno em sua forma madura. Etapas adicionais de purificação são necessárias para remover componentes solúveis de *P. pastoris* e colágeno e pró-colágeno fragmentados ⁽¹⁰⁵⁾.

O produto final obtido por esse sistema de produção consiste em aproximadamente 90 a 95% de colágeno mononuclear e 5 a 10% de dímeros, dependendo do tipo de colágeno produzido ⁽¹⁰⁵⁾. Esses dados enfatizam ainda mais as diferenças entre o colágeno recombinante e os derivados de tecidos animais, que em geral não são homogêneos. Como exemplo pode-se citar o colágeno tipo I bovino isolado a partir da pele no qual apenas 46% das moléculas de colágeno estão arranjadas em estrutura triplo-helicoidal ⁽¹³⁵⁾.

O conteúdo de hidroxiprolina, razão entre hidroxiprolina e prolina total, no colágeno recombinante humano (*Recombinant Human Collagen* – rhC) derivado de *P. pastoris* é bastante semelhante ao encontrado no colágeno humano natural, estimados em 0,47 e 0,46 respectivamente, indicando um nível de alta hidroxilação das cadeias rhC ^(105, 136). O rhC tipo I (rhC-I) obtido em *P. pastoris* possui temperatura de desnaturação mais próxima da temperatura corporal do que a apresentada pelo colágeno derivado de tecidos bovinos, 38 e 39,8 °C respectivamente ⁽¹⁰⁵⁾.

2.2.2.1- O uso de rhC-I em engenharia de tecidos

Dependendo da aplicação desejada, o rhC pode ser reconstituído em fibras que podem então se arranjar na forma de esponjas porosas, membranas, géis entre outros. O rhC-I tem sido utilizado como uma tecnologia emergente na

engenharia de tecidos, sendo que importantes avanços na reconstrução óssea e decartilagem, além de tecidos como pele e córnea, já foram obtidos.

Nos Estados Unidos da América, são realizadas anualmente 500.000 cirurgias ortopédicas que visam promover o crescimento ósseo com uso de enxertos ou materiais substitutivos ósseos ⁽¹³⁷⁾. Devido à escassez de material ósseo doado bem como ao potencial da transmissão de doenças, muita atenção se volta para o desenvolvimento de biomateriais sintéticos para ser utilizado na regeneração óssea. O Collagraft (Collagraft, Zimmer and Collagen Corporation, Warsaw, IN, EUA), é um biomaterial composto de uma mistura de hidroxiapatita porosa e colágeno tipo I derivado de animais, é empregado no tratamento de fraturas de ossos longos há mais de uma década ^(138, 139).

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante em ECM obtidas em animais e é utilizada devido a sua capacidade de osteocondução na regeneração de tecido ósseo ^(140, 141). As carbodiimidas são reagentes catalizadores para *crosslinking* que promovem a formação de ligações cruzadas covalente entre os grupos de aminoácidos reativos ⁽¹⁴²⁾. O 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) carbodimida (*1-(3-Dimethylaminopropyl)-1'-ethylcarbodiimide hydrochloride* – EDC) é uma carbodiimida bastante utilizada na obtenção de *crosslinking* em rhC-I e o colágeno obtido com o seu uso apresenta uma estrutura porosa com área livre suficiente para permitir crescimento e invasão, proliferação e diferenciação celular além da difusão de nutrientes e remoção dos subprodutos metabólicos ⁽¹⁴³⁾.

A fim de avaliar o comportamento *in vitro* de osteoblastos em rhC-I, estas células foram isoladas de fetos de ratos com 19 dias de desenvolvimento e cultivadas em rhC-I. Após 9 dias nesse sistema de cultura suplementado com ácido ascórbico e β -glicerofosfato as células foram capazes de formar nódulos positivos para azul alciano⁷ e após 15 dias os nódulos foram positivos para a coloração de Von Kossa⁸. Depois de 3 meses de cultura em rhC-I, a

⁷ O azul de alciano evidencia os diversos tipos de glicosaminoglicanos ácidos presentes nas mucinas ou proteoglicanos ácidos, não sulfatados e sulfatados, presentes principalmente na matriz cartilaginosa

⁸ Coloração específica para o íon cálcio, permitindo detectar as fases de mineralização dos tecidos em

diferenciação osteogênica foi confirmada não somente pela quintuplicação do nível de atividade de fosfatase alcalina, mas também pela presença de matriz similar a osso mineralizado com corpos similares a osteócitos no interior da matriz de rhC-I ⁽¹⁰⁵⁾.

Os resultados obtidos para biocompatibilidade e atividade osteocondutiva de rhC-I *in vivo* são igualmente promissores. Um estudo utilizou implantes de rhC-I para tratar defeitos ósseos (3 X 5 mm) em crânios de ratos e após um período de avaliação de 28 dias pouca ou nenhuma inflamação foi observada no local do implante sugerindo a biocompatibilidade do rhC-I *in vivo* ⁽¹⁰⁵⁾. Além disso, após o este período foi observada a cicatrização do defeito ósseo, o que não ocorreu no grupo controle (sem matriz). Uma vez que os implantes não continham células no momento da cirurgia, ficou evidente que o biomaterial possui interessante potencial osteocondutor ⁽¹⁰⁵⁾.

A osteoartrite é uma doença degenerativa das cartilagens articulares que leva a perda progressiva dos movimentos e dor e afeta 27 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América ⁽¹⁰⁵⁾ e 15 milhões no Brasil⁹. As opções de tratamento são limitadas e em geral envolvem atividades fisioterápicas, uso de analgésicos, antiinflamatórios não-esteróides ou cirurgias em quadros mais graves ⁽¹⁴⁴⁾. Esses tratamentos possuem eficácia clínica limitada e melhorias no tratamento utilizando os princípios da engenharia de tecidos podem promover reparo biológico as cartilagens degeneradas.

Já foi documentado que condrócitos autólogos obtidos de áreas não envolvidas em lesões cartilaginosas foram capazes de promover regeneração tecidual, durante um período de avaliação de 36 meses, quando implantados sobre áreas de cartilagem degeneradas e mantidos em posição com o uso de uma porção de periósteo retirado da tíbia ⁽¹⁴⁵⁾. Uma alternativa cirúrgica menos agressiva intenta em substituir o uso periósteo saudável no transplante de condrócitos oferecendo por *scaffolds* a base de colágeno. Um protótipo de membrana a base de rhC-I é capaz de sustentar o crescimento *in vitro* de

⁹ Dados do Ministério da Saúde

condrócitos, manter o seu fenótipo de diferenciação e estimular a deposição de matriz cartilaginosa como colágeno II, XI e agregans ⁽¹⁰⁵⁾. Um teste realizado com matrizes tridimensionais de rhC-I mostrou que em culturas de longo termo, o *scaffold* não altera o fenótipo dos condrocítico e nem diminui sua capacidade de deposição de matriz extracelular cartilaginosa ⁽¹⁰⁵⁾.

Estima-se que 10 milhões de pessoas sofram de perda de visão devido a doenças ou defeitos presentes na córnea ⁽¹⁴⁶⁾. Muitos casos só podem ser resolvidos com a realização de transplante alogênico, o que se torna um grande empecilho devido a escassez de doadores. Matrizes de colágeno de origem animal são capazes de promover a regeneração celular da córnea e de nervos quando implantadas em modelos animais ^(147, 148). O problema relacionado ao uso dessas matrizes em humanos é a falta de alto grau de pureza além do potencial de causar reações imunes ⁽¹⁴⁹⁾. Uma vez que o rhC possui premissas de ser mais seguro, ter composição química definida e possuir estrutura final previsível, seu uso tem sido explorado na produção de substitutos córneos ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾.

Estudos mostram que o rhC-I é um biomaterial capaz de produzir uma matriz com transparência e cristalinidade necessárias além de ser resistente o suficiente para suportar os procedimentos cirúrgicos ^(150, 153). Quando matrizes de rhC-I foram implantadas em modelos animais por 12 meses, esse biomaterial foi capaz de promover um regeneração estável dos tecidos da córnea, incluindo células e nervos ^(150, 152). A matriz é gradualmente substituída por colágeno do hospedeiro, mas o resultado obtido após o período de avaliação é uma córnea com morfologia, vascularização, inervação e clareza óptica similar a córnea natural e saudável ⁽¹⁵⁰⁾.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi investigar o comportamento de SHED em *scaffolds* injetáveis frente a proliferação e diferenciação odontoblástica *in vitro* e *in vivo*. A hipótese testada foi a de que SHED é capaz de originar polpa dental funcional quando injetada no interior de canal radicular de pré-molares humanos com ápice aberto *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Toda a parte experimental desta pesquisa foi realizada na *School of Dentistry* da *University of Michigan*. Todo o material empregado, biológico ou não, foi obtido e fornecido pela referida Instituição. O projeto de pesquisa intitulado *Development of a novel model for the engineering of the dental pulp tissue*, coordenado pelo Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, foi aprovado sob o n. 09546 pelo *University Committee on Use and Care of Animal* da *University of Michigan* (Anexo A).

4.1 CULTURA CELULAR

SHED, gentilmente fornecidas pelo Dr. Songtao Shi (Dental Biology Unit, Craniofacial Skeletal Diseases Branch, NIH, Bethesda, MD, EUA) foram cultivadas em meio de cultura tipo meio essencial mínimo modificação alfa – (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification – MEM- α , Gibco MEM- α , Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Fetal Bovine Serum Certified Heat-Inactivated– FBS, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco Penicilin-Streptomycin, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Em todos os experimentos foram utilizadas células entre as passagens 3 a 8. As passagens foram efetuadas sempre que as células ocupassem aproximadamente 70% da superfície do frasco.

4.2 PREPARO DOS SCAFFOLDS INJETÁVEIS

O *scaffold* de peptídeos auto-organizáveis RADA-16 (1%w/v, BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) foi preparada diluindo-se a solução purificada

de peptídeos RADA-16 em solução de sucrose 10% (Sucrose Crystal, J.T. Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ, EUA) afim de se obter uma concentração final de RADA-16 igual a 20% v/v. Para promover a ressuspensão das SHED no *scaffold*, as células foram dissociadas utilizando tripsina 0,25% (Gibco Penicilin-Streptomycin, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), lavadas duas vezes em solução de sucrose 10% (Sucrose Crystal, J.T. Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ, EUA), contadas e ressuspendidas na solução de RADA-16 previamente preparada.

O preparo dos oligômeros do *scaffold* a base de rhC-I foi realizado adicionando 1 mL de 0,2 M de solução de NaPO₄ (pH 11,2) a 10 mL de solução 3 mg/mL de rhC-I em 10 mM de HCl (rhCollagen Type I, Fibrogen, South San Francisco, CA, EUA). A solução foi posicionada sobre um agitador em baixa rotação em temperatura ambiente por 2 horas para se obter uma suspensão fibrilar. Em seguida foi adicionado 1,22 mL de solução de 1,5% de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) carbodimida (EDC, Sigma, Saint Louis, MO, EUA) em 20 mM de NaPO₄ (pH de 7,2). A solução foi suavemente agitada por 14 horas em temperatura ambiente para promover o *cross-linking*. A solução obtida foi submetida à diálise (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Scientific Pierce, Waltham, MA, EUA) em 4 litros de solução 10 mM de HCl a 4 °C por 8 horas e os oligômeros solúveis (aproximadamente 2,62 mg/mL) recuperados.

Para promover a ressuspensão das SHED no *scaffold*, as células foram dissociadas utilizando tripsina 0,25%, lavadas em solução salina fosfatada (*phosphate buffer saline* – PBS, Gibco PBS pH 7,4, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), contadas e ressuspendidas em MEM- α . Para preparar 1 mL do *scaffold* de rhC-I com SHED foram misturados 0,38 mL de 2X DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media 2X, Millipore, Milford, MA, EUA), 0,1 mL de FBS, 0,38 mL de rhC com *cross-linking* de 2,62 mg/mL, 0,38 μ L de solução 10N de NaOH e 0,1 mL de MEM- α com SHED em suspensão, nesta ordem. Os reagentes foram misturados rapidamente e as possíveis bolhas removidas utilizando-se uma ponteira de pipeta. A solução obtida deveria se apresentar em uma cor

vermelha viva indicando o correto pH. Caso o contrário, alguns μL de 0,1 M de HCl ou NaOH eram adicionados para ajustar o pH da solução.

4.3 VIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO DE SHED EM SCAFFOLDS INJETÁVEIS *IN VITRO*

4.3.1 Proliferação de SHED em *scaffold* injetáveis

SHED foram resuspendidas em RADA-16 e rhC-I (10×10^4 células/mL) e 50 μL de cada *scaffold* contendo células foi injetado em três poços de sete placas de 96 poços (Corning Costar cell culture plates 96 well flat bottom, Corning Inc., Corning, NY, EUA). Os conjuntos foram armazenados em estufa a 37 °C por 1 hora e 50 μL de meio de cultura foi adicionado a cada poço, perfazendo um volume total de 100 μL . Diariamente, 30 μL de meio de cultura eram renovados em cada poço.

A cada 24 horas, um placa foi removida da estufa e 50 μL do meio de cultura foi cuidadosamente removido de cada um dos poços com uso de pipeta graduada. As células foram fixadas com 20 μL de solução de formalina tamponada 10% (Formalin Buffered 10%, Fisher Chemical, Rockford, IL, EUA) por 15 minutos. Posterior a fixação, os 20 μL superficiais foram removidos e 30 μL de PBS foram adicionados e mantidos por 15 minutos para promover uma lavagem e diluição da formalina remanescente. Retirados os 30 μL superficiais, procedeu-se com a coração dos filamentos de actina F das células com 30 μL de faloidina 2,5% em PBS (Alexa Fluor 488 phalloidin, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 30 minutos no escuro. Os poços foram novamente lavados com 50 μL de PBS por 15 minutos. Após remover mui cautelosamente os 80 μL sobrenadantes, os núcleos foram corados com DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Um *grid* com 9 quadrados foi confeccionado na tampa de uma placa de 96 poços e 6 campos do *grid* foram escolhidos aleatoriamente e utilizados para contar as células de cada um dos

poços em microscópio óptico sob fluorescência. Foram contados os núcleos corados de azul pelo DAPI ($\lambda=350$ nm) conferindo-se a localização com a marcação da actina F ($\lambda=495$ nm) para evitar a contagem de artefatos de imagem. O estudo foi realizado em três seções independentes.

Para observar o crescimento celular em ambiente tridimensional, *scaffolds* com SHED foram injetados em placas de cultura de 35 mm de diâmetro com superfície inferior de vidro (P35G-0-10-C, MatTek Corp., Ashland, MA, EUA). Depois de 1 e 7 dias as células foram fixadas e coradas como previamente descrito e observadas em microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA) equipado com laser de argônio para FITC ($\lambda=488$ nm) e ultravioleta para DAPI ($\lambda=350$ nm) para captura de imagens em série Z. As imagens obtidas foram reconstituídas e projeções foram obtidas com uso de *software* específico (IMARIS 7.0, Bitplane Inc., Saint Paul, MN, EUA).

4.3.2 Viabilidade celular e diferenciação odontoblástica de SHED dentro de canal radicular de pré-molares humanos extraídos

Para esta etapa foram utilizados pré-molares humanos com ápice aberto extraídos por necessidades ortodônticas no *Department of Oral Surgery* do *University of Michigan Hospital*. Após a extração, os dentes foram armazenados em MEM- α a 4 °C por um período não superior a 60 dias.

Para avaliar a viabilidade e o potencial de diferenciação odontoblástica de SHED injetadas no canal radicular, os dentes tiveram suas coroas removidas com o uso de disco diamantado em baixa rotação sob refrigeração com PBS. Após expor o conduto radicular, o tecido pulpar foi gentilmente removido com uso de limas tipo K-Flex compatíveis com o diâmetro do canal (Dentsply-Maillefer Instruments, Ballaigues, Orbe, Suíça) para evitar a instrumentação adicional do canal radicular. Os dentes foram imersos em soluções de álcool

etílico com gradientes decrescentes (100, 90, 80 e 70° GL) sob intensa agitação por 20 minutos cada, posicionados em placa de Petri com PBS e armazenados em estufa 37 °C por 14 horas.

Para que as células injetadas nos condutos radiculares tivessem acesso ao meio de cultura somente pelo ápice do dente, *inserts* para placa de 12 poços (Cell Culture Inserts 24 well 3µm pores, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA) receberam em suas membranas um pequeno corte realizado com bisturi #12 e foram invertidamente posicionados em placas de cultura de células de 6 poços. e os dentes foram transfixados na membrana. O conjunto foi novamente posicionado na estufa por 2 horas para homogeneizar a temperatura da estrutura dental remanescente e em seguida ambos os *scaffolds* rhC-I e RADA-16 com SHED (6×10^6 células/mL) foram injetados nos condutos radiculares, resultando em um total de 24 dentes para cada *scaffold*. Os conjuntos foram novamente levados a estufa por 1 hora e então MEM- α foi lentamente vertido nos poços pela parede lateral de tal maneira que somente o ápice dos dentes ficasse coberto pelo meio de cultura o qual era substituído a cada 48 horas. Os controles negativos utilizados foram SHED em placa de cultura de 60 mm e SHED ressuspensa em *scaffold* em placa de cultura de 35 mm. Como controle positivo foi utilizado DNA complementar (*complimentary DNA* – cDNA) de odontoblastos obtidos de terceiros molares extraídos.

A expressão gênica sugestiva de diferenciação odontoblástica foi avaliada a cada 7 dias coletando-se o conteúdo de 6 raízes de cada grupo utilizando-se pipetas graduadas e escovas interproximais (Oral B Interdental Brush, Cylindrical, Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) previamente autoclavadas. A extração do RNA do material obtido foi realizada com o uso de solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato (TRIzol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguida da síntese de cDNA (*complimentary DNA* – cDNA) com uso de kit comercial (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e protocolo preconizado pelo fabricante.

Para a detecção de RNAm para fosfoproteína ácida dentina-específica (*dentin matrix acidic phosphoprotein* – DMP-1), sialofosfoproteína dentinária (*dentin sialophosphoprotein* – DSPP), matriz extracelular de fosfoglicoproteína (*matrix extracellular phosphoglycoprotein* – MEPE) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* – GAPDH) foram utilizados *primers* específicos para detecção de genes humanos obtidos de acordo com a sequência de cDNA publicada no GenBank (Quadro 4.1).

A transcrição reversa e amplificação do cDNA foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) conforme descrito no quadro 4.2. As amostras obtidas foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose 3% (Ultrapure Agarose, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL) por 50 minutos a 80 Volts. A detecção dos produtos foi realizada à luz ultra-violeta.

Quadro 4.1 – Sequência utilizada para obtenção dos *primers*

Gene	Sequência <i>Sense</i> 5'-3'	Sequência <i>Anti-sense</i> 5'-3'	Tamanho
DSPP	GACCCCTTCATTGACCTCAACT	TGCCATTTGCTGTGATGTTT	182 bp
DMP-1	CAGGAGCACAGGAAAAGGAG	CTGGTGGTATCTTGGGCACT	213 bp
MEPE	GCAAAAGCACCCATCGTATT	CTGCCCTCTACAAGGCTGAC	385 bp
GAPDH	GACCCCTTCATTGACCTCAACT	CACCACCTTCTTGATGTCATC	683 bp

Quadro 4.2 – Ciclagem térmica empregada no RT-PCR

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ocorrências
Transcrição	desnaturação	55	30	única
		94	2	única
	anelamento	55	0,5	35
Amplificação	extensão	72	1	35
	desnaturação	94	0,5	35
Extensão final		72	10	única

4.4 USO DE SHED E SCAFFOLDS INJETÁVEIS NA OBTENÇÃO DE POLPA DENTAL FUNCIONAL *IN VIVO*

4.4.1 Preparo dos espécimes, implantação, explantação e preparo para análises

O protocolo para o uso de dentes humanos e animais nesta etapa da pesquisa foi aprovado pelo *University Committee on Use and Care of Animal* da *University of Michigan* (protocolo 09546 - *Development of a novel model for the engineering of the dental pulp tissue*).

SHED foram geneticamente modificadas *in vitro* com vetor lentiviral para promover a expressão de GFP. A infecção foi realizada por 14 horas. Após, o meio contendo o vetor viral substituído por meio de cultura MEM- α contendo 50 ng/mL de puomicina (Puromycin Dihydrochloride Selection Antibiotic, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para promover a seleção das células GFP positivas (SHED/GFP+). As células foram expandidas no meio com puomicina e foram avaliadas diariamente sob fluorescência ($\lambda=395$ nm).

Após 14 dias de cultura, citometria de fluxo foi realizada em para avaliar a e eficácia e qualidade da transdução e seleção. Para isto, 1×10^6 SHED e SHED/GFP+ foram ressuspendidas em tubos contendo 5 mL de meio de cultura sem e com puomicina respectivamente e solução 1mg/mL Hoechst 33342 foi adicionado a cada tubo a fim de se obter um concentração final de 10 μ M. A solução foi incubada a 37°C por 45 minutos. As células foram iluminadas com laser de argônio sintonizado para ultra-violeta ($\lambda=353-365$ nm). A fluorescência detectada a 480 nm (FACSCalibur Cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e os dados obtidos analisados (WinMDI 2.8, Scripps Institute, La Jolla, CA, EUA).

SHED e SHED/GFP+ foram ressuspensas em RADA-16 e rhC-I (6x10⁶ células/mL) e injetadas em aízes de pré-molares humanos com ápice aberto transfixados na membrana de inserts. Os controles negativos usados foram raízes onde os scaffolds foram injetados sem células (Quadro 4.3). Os dentes foram armazenados em estufa 37°C por 30 minutos previamente à implantação.

As raízes foram implantadas bilateral e subcutaneamente no dorso de camundongos machos com imunodeficiência combinada grave (Severe Combined Immunodeficiency – SCID) com idades entre 5 e 7 semanas (CB.17 SCID, Charles River, Wilmington, MA, EUA). Os dentes foram randomicamente selecionados¹⁰ (exceto os grupos com SHED/GFP+) seguindo um critério que não permitia que um camundongo recebesse dois dentes de um mesmo scaffolds independente da condição experimental ou controle. Os grupos contendo SHED/GFP+ foram implantados em camundongos específicos para evitar que esses grupos sofressem alguma influência da tetraciclina a ser injetada nos animais como será oportunamente descrito. O implantes contendo SHED/GFP+ foram utilizados exclusivamente para comprovar a origem do tecido e todas as análises histológicas, morfológicas e imunohistoquímicas (exceto para GFP) foi realizada com SHED negativas para GFP.

A técnica cirúrgica empregada exigiu a injeção intramuscular de solução 0.85 de quetamina 4,25 mg/kg (Ketaset, Fort Dodge, IA, EUA) e 15% de xilazina 0.25 mg/kg (AnaSed, Lloyd Laboratories, Sheanoah, IA, EUA) para promover a anestesia dos camundongos. O dorso dos camundongos recebeu uma incisão superficial e em ambos os lados a pele foi divulsionada da camada muscular com uso de tesoura sem ponta. Os dentes foram inseridos nos bolsos criados, a incisão reduzida e unida com uso de cola veterinária (3M Vetbon Tissue Adhesive, 3M, Saint Paul, MN, EUA).

A evidenciação de neoformação dentinária foi realizada com injeções de tetraciclina hidrocloreada (T3383, Sigma-Aldric Corp., St. Louis, MO, EUA). No décimo dia após a implantação, quatro camundongos de cada grupo (excetuando-se os com SHED/GFP+) receberam uma injeção intraperitoneal de

¹⁰ Todas as escolhas randômicas desse trabalho foram realizadas em www.random.org

tetraciclina (41,6 nmol/g de massa corporal) ⁽¹⁵⁴⁾ a qual foi administrada mais 3 vezes a cada cinco dias. Depois da última administração, seguiu-se um período de 10 dias sem injeções.

Após 35 dias da implantação, todos os camundongos foram eutanasiados por meio de dosagem excessiva de solução anestésica seguido de deslocamento cervical e os implantes foram recuperados.

As raízes utilizadas para verificar a formação do tecido pulpar foram imediatamente armazenados em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas a 4 °C para promover a fixação dos tecidos obtidos e descalcificados com uso de solução de ácido hidrocloreídrico e EDTA (Decalcifier II, Surgipath Medical Industries, Inc., Richmond, IL, EUA). A descalcificação foi realizada de 8 a 22 horas em temperatura ambiente. A partir da quarta hora do início da descalcificação os dentes eram retirados da solução para serem inspecionados tatilmente para averiguar a sua rigidez e a necessidade de continuar com o processo. A partir dos espécimes foram confeccionadas lâminas histológicas coradas com eosina e hematoxilina (*Hematoxilin and Eosin* – H&E) e lâminas sem coloração para realização de imunohistoquímica.

Os espécimes utilizados para a verificar a neoformação dentinária foram armazenados em PBS imediatamente depós a explantação e seccionados em seus longos eixos com uso de disco diamantado em baixa rotação e intensa refrigeração e examinados empregando microscopia confocal (Olympus Fluoview 500 Laser Scanning Microscope, Olympus, Melville, NY, EUA) utilizando laser ultravioleta (405 nm, 35 mW) filtro de excitação (405–488 nm) e filtro de barreira (465–495 nm). Os controles negativos utilizados foram espécimes contendo SHED injetadas com ambos os *scaffolds* implantados em camundongos que não receberam injeções de tetraciclina e como controle positivo foi utilizado o incisivo central de um camundongo.

Quadro 4.3 – Composição e descrição dos grupos implantados

Grupo	Descrição	n
Experimentais		
RADA-16/SHED	<i>scaffold</i> injetado com SHED	6
RADA-16/SHED/GFP+	<i>scaffold</i> injetado com SHED/GFP+	2
rhC-I/SHED	<i>scaffold</i> injetado com SHED	6
rhC-I/SHED/GFP+	<i>scaffold</i> injetado com SHED/GFP+	2
Controle		
RADA-16/Control	<i>scaffold</i> injetado sem células	4
rhC-I/Control	<i>scaffold</i> injetado sem células	4

4.4.2 Análise de características morfológicas

O número de células que compõem a “camada odontoblástica” da polpa neoformada foi determinado contando-se o número de células localizadas na parede dentinária. Para tanto, 10 campos randomicamente selecionados de 3 lâminas obtidas com cada *scaffold* receberam um *grid* contendo 5 retângulos (Figura 4.1 A). A distância entre as bordas inferior e superior internas de cada retângulo era de 25 µm. As células localizadas no interior de cada retângulo foram demarcadas (Figura 4.1 B) com uso de *software* para processamento de imagens (Adobe Photoshop 7.0, Adobe, Seattle, WA, EUA) e esta imagem foi avaliada com uso de *software* analisador de imagens (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA) o qual forneceu o número de odontoblastos presentes em 125 µm de parede de dentina por campo analisado. O controle positivo utilizado foi um pré-molar humano com ápice aberto.

Figura 4.1 – Método utilizado para contagem de odontoblastos. A) *Grid* demarcando a área de contagem. B) Células demarcadas e posteriormente contabilizadas

A determinação da densidade microvascular foi realizada contando-se os vasos sanguíneos de 10 campos aleatoriamente (40 X) selecionados em 3 lâminas por grupo pelo autor e um avaliador cego para este estudo. O controle positivo utilizado foi um pré-molar humano com ápice aberto.

4.4.3 Análise imunohistoquímica

Lâminas com cortes histológicos embebidos em parafina foram desparafinizadas de acordo com o protocolo descrito na quadro 4.4. A recuperação de epítomos foi realizada com a lâminas imersas em solução de recuperação de antígenos 1X (Target Retrieval Solution 10X, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 20 minutos a 120 °C sob pressão de 16,5 psi (Decloaking chamber, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) seguido de 20 minutos a 95 °C sem uso de pressão adicional.

As lâminas foram lavadas em solução tampão 1X (Dako Wash Buffer 10X, Dako, Carpinteria, CA, EUA)¹¹. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos (Peroxidase 1, Dako Cytomation EnVision+HRP (AEC), DakoCytomation, Inc. Carpinteria, CA, EUA) seguido do bloqueio de coloração não específica efetuado por 15 minutos

¹¹ Após a realização de cada uma das etapas mencionadas nos diferentes protocolos de imunohistoquímica foram realizadas 2 lavagens por 10 minutos sob suave agitação utilizando-se solução tampão

também (Background Sniper, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) ambos em temperatura ambiente.

A marcação para Fator VIII foi realizada com uso de anticorpo anti F^{VIII} (Factor VIII Related antigen Ab1, Neomarkers, Fremont, CA, EUA). O anticorpo utilizado na concentração 1:400 (Dako Antibody Diluent, Dako, Carpinteria, CA, USA) foi incubado por 16 horas a 4 °C. A incubação do polímero (Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit, DAKO Cytomation EnVision+HRP (AEC), DakoCytomation, Inc. Carpinteria, CA, EUA) foi realizada por 40 minutos em temperatura ambiente e a reação foi revelada sob observação em microscópio óptico utilizando cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (3-amino-9-ethyl-carbazole – AEC, AEC chromogen substrate buffer (DAKO Cytomation EnVision+HRP (AEC), DakoCytomation, Inc. Carpinteria, CA, EUA) por aproximadamente 25 minutos.

A identificação de antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* – PCNA) foi realizada utilizando anticorpo (PCNA (F-2), Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EUA) em concentração de 1:300 por 16 horas a 4 °C. Os cortes foram incubados com a sonda e polímero contra anticorpo criado em coelhos (MACH3 Mouse/Rabbit-Probe HRP Polymer Kit, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) por 40 minutos cada em temperatura ambiente. A reação foi revelada com solução de 3-3'-diaminobenzidina (3-3' *diaminobenzidine* – DAB, DAB Chromogen Kits, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA) sob observação em microscópio óptico por aproximadamente 45 segundos. As células positivas para PCNA foram contadas em 10 campos escolhidos aleatoriamente em 3 lâminas por grupo pelo autor e um avaliador cego para este trabalho utilizando softwares de processamento e analisador de imagens.

A identificação de GFP foi realizada com anticorpo (Anti-TurboGFP(d) antibody, Evrogen, Moscou, Rússia) diluído em 1:100 seguindo o protocolo utilizado para PCNA. A revelação sob microscopia óptica foi realizada por aproximadamente 3 minutos. O controle negativo para GFP foi feito com pré-molar humano extraído.

Os resultados das imunohistoquímicas das polpas formadas com SHED e *scaffolds* injetáveis foram comparados com colorações obtidas em pré-molar humano com ápice aberto extraído devido à necessidade ortodôntica (Controle +). O controle negativo de todas reações imunohistoquímicas foi realizado com anticorpo contra imunoglobulina G (IgG controle) e a montagem das lâminas foi feita com solução aquosa (VectaMount AQ, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA).

Quadro 4.4 – Sequência das imersões utilizadas para a desparafinização dos cortes histológicos

Solução	Tempo (min)
Xilol	6
Xilol	6
Álcool 100 °GL	3
Álcool 100 °GL	3
Álcool 95 °GL	2
Álcool 90 °GL	2
Álcool 80 °GL	2
Álcool 70 °GL	0,5
Água milique	5
Água milique	5

4.4.4 Detecção de apoptose

O nível de apoptose celular foi determinado utilizando o ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Lâminas foram desparafinizadas segundo descrito no quadro 4.4. Os cortes histológicos foram permeabilizados com 0,1% Triton X-100 (Triton X-100, Sigma-Aldric Corp., St. Louis, MO, EUA) por 8 minutos em temperatura ambiente e lavados em PBS por 10 minutos sob suave agitação. O reagente para a reação de TUNEL foi preparado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e foi aplicado sobre as lâminas que foram incubadas no escuro a 37 °C por 60

minutos seguido de imersão em PBS por 15 minutos. O controle negativo da reação foi realizado com solução de rotulamento sem transferase terminal. Após imergir as lâminas em PBS por 15 minutos e o conversor anti-fluoresceína POD conjugado foi adicionado as lâminas e incubado a 37 °C por 30 minutos. As células em apoptose foram reveladas com AEC sob microscopia óptica e contadas.

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (se necessário) com nível global de significância de 5% (IBM SPSS Statistics 15, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ODONTOBLÁSTICA DE SHED EM SCAFFOLD INJETÁVEIS *IN VITRO*

A figura 5.1 mostra a curva de crescimento das SHED ressuspensas nos *scaffolds* obtida a partir de contagem realizada por 7 dias. A análise estatística não apontou diferença significativa para o número de células obtidas ao final do período de avaliação entre os dois *scaffolds* avaliados. Ao observar a figura percebe-se que a tendência do aumento do número de células é deveras semelhante em ambos os *scaffolds*. As figuras 5.2 e 5.3 mostram as projeções obtidas em microscopia confocal de varredura a laser de SHED nos *scaffolds* após 1 e 7 dias. Nota-se que as SHED possuem um comportamento semelhante frente ao crescimento nos *scaffolds*: as células que se apresentam com forma esféricas e espaçadas no dia 1 tendem a multiplicar-se e adquirir uma morfologia alongada estabelecendo uma rede celular tridimensionalmente distribuída no *scaffold* ao final do dia 7.

Figura 5.1 – Curva de crescimento obtida para SHED em ambos *scaffolds* injetáveis

Figura 5.2 – Projeções obtidas a partir de microscopia confocal de varredura a laser de SHED nos *scaffolds* após 1 e 7 dias

Figura 5.3 – Projeções obtidas a partir de microscopia confocal de varredura a laser de SHED nos *scaffolds* após 1 e 7 dias (Falloidina: verde, DAPI: azul)

A figura 5.4 mostra os produtos de RT-PCR obtidos para avaliar a viabilidade celular e capacidade de diferenciação odontoblástica de SHED dentro de canal radicular de pré-molares humanos extraídos por 28 dias. Nesta figura, para ambos os *scaffolds* testados, o grupo “Controle” diz respeito a SHED cultivadas em placa de cultura celular, “*Scaffold*” se refere a SHED ressuspendidas nos *scaffolds* e cultivadas em placas de cultura celular e

“*Scaffold* + raiz” representa SHED ressuspendidas em *scaffold* e injetadas no canal radicular de pré-molares humanos extraídos.

É possível perceber que ao final do período de avaliação, em todas as condições experimentais SHED mantêm-se viáveis. O aumento da expressão gênica sugestiva de diferenciação odontoblástica ocorreu somente no grupo “*Scaffold* + raiz” para ambos os *scaffolds*. Não houve expressão dos genes estudados em nenhum dos grupos controles (Controle e *Scaffold*).

Figura 5.4 – Análise por RT-PCR da expressão gênica das SHED injetadas no canal radicular e grupos controle

5.2 USO DE SHED E SCAFFOLDS INJETÁVEIS NA OBTENÇÃO DE POLPA DENTAL FUNCIONAL *IN VIVO*

A figura 5.5 mostra composições de micrografias obtidas de lâminas coradas para H&E de espécimes que permaneceram implantados nos camundongos por 35 dias. É possível visualizar o crescimento tecidual no longo

eixo do canal radicular nas raízes onde os *scaffolds* foram injetados com SHED (RADA-16 e rhC-I).

Em todos os espécimes onde *scaffolds* foram injetados sem células (Controle -) observou-se somente a presença de necrose coagulativa. Nesta figura é mostrado Controle - para RADA-16.

A figura 5.6 mostra as mesmas composições transversais mostradas à esquerda na figura 5.5. É possível visualizar um adensamento celular adjacente a parede dentinária em ambas as composições experimentais. Destaca-se ainda a ausência de áreas hiperêmicas na extensão do tecido obtido.

Na figura 5.7 são apresentadas micrografias das seções longitudinais obtidas e pode-se perceber que o tecido pulpar obtido com RADA-16 e rhC-I apresenta características morfológicas de tecido conjuntivo frouxo, com presença de fibroblastos e fibras colágenas. Micrografias ampliadas são apresentadas nas figuras 5.8, 5.9 e 5.10 para privilegiar a visualização.

Figura 5.5 – Composições de micrografias obtidas de lâminas coradas para H&E de espécimes que permaneceram implantados nos camundongos por 35 dias

Figura 5.6 – Composições da figura 5.4 ampliadas

Figura 5.7 – Micrografias das seções longitudinais do tecido pulpar obtido com SHED e RADA-16 e rhC-I e controle positivo (pré-molar humano com ápice aberto)

Figura 5.8 – Micrografias dos tecidos formados com *scaffolds* injetáveis e SHED e controle positivo

Figura 5.9 – Micrografias dos tecidos formados com *scaffolds* injetáveis e SHED e controle positivo

Figura 5.10 – Micrografias dos tecidos formados com *scaffolds* injetáveis e SHED e controle positivo

A figura 5.11 mostra camadas odontoblásticas obtidas com uso de de SHED e *scaffolds* injetáveis juntamente com a naturalmente existente em um pré-molar humano.

Figura 5.11 – Camadas odontoblásticas da polpa obtida com RADA-16 e rhC-I e controle positivo

A figura 5.12 e 5.13 apresentam, respectivamente, a densidade microvascular e o número de odontoblastos contabilizados nas polpas obtidas com SHED e *scaffolds* injetáveis e controle positivo. Em ambas as análises, não houve diferença estatística entre os valores obtidos para os três grupos ($p < 0.05$).

Figura 5.12 – Densidade microvascular obtida nas polpas obtidas com SHED e *scaffolds* injetáveis e controle positivo

Figura 5.13 – Odontoblastos contados nas polpas obtida com SHED e *scaffolds* injetáveis e grupo controle positivo

A figura 5.14 mostra SHED depois de 24 horas da troca de meio com vetor lentiviral por meio contendo puromicina. Na figura 5.13A é possível perceber uma grande quantidade de células mortas devido a seleção promovida pelo antibiótico. As imagens obtida com uso de fluorescência mostram células verdes, positivas para GFP.

Figura 5.14 – SHED depois de 24 (A e D); 48 (B e E) e 96 horas (C e F) do início da seleção com puromicina

A alta eficiência da expressão de GFP pelas SHED, bem como da seleção antibiótica, foi confirmada por citometria de fluxo como mostrado na figura 5.15 onde é possível perceber que após 8 dias do início da seleção antibiótica 99,25% das SHED foram consideradas GFP positivas.

Figura 5.15 – Citometria de fluxo mostrando o *gate* para o grupo controle e o alto nível de células GFP positivas após 8 dias de seleção antibiótica

A figura 5.16 mostra os resultados da imunohistoquímica para detecção de GFP. Nesta figura o Controle - se refere a um pré-molar humano extraído e que naturalmente não deve expressar GFP. Nessa figura são apresentados os controles feitos com imunoglobulina G (IgG) para mostrar que a coloração obtida não é inespecífica ou do *background*.

Figura 5.16 – Expressão imunohistoquímica de GFP na polpa obtida com SHED e *scaffolds* injetáveis e controle negativo

A figura 5.17 apresenta os resultados obtidos para Fator VIII. Pode-se notar que em ambos os tecidos obtidos com uso de RADA-16 e rhC-I o endotélio dos vasos sanguíneos apresentados se mostra bastante corado, denotando um nível de maturação endotelial semelhante ao obtido em polpa dental humana natural.

Figura 5.17 - Expressão imunohistoquímica de Fator VII na polpa obtida com SHED e *scaffolds* injetáveis e controle negativo

A figura 5.18 apresenta a expressão imunohistoquímica para PCNA. Percebe-se nos tecidos formados a partir de SHED um grande número de células positivas, indicando um alto grau de proliferação tecidual comparável com o obtido no controle positivo. De fato quando a atividade proliferativa foi quantificada notou-se não haver diferença estatística entre o número de células positivas para PCNA entre os grupos experimentais e controle, como mostrado na figura 5.19.

Figura 5.18 - Expressão imunohistoquímica de PCNA na polpa obtida com SHED e *scaffolds* injetáveis e controle positivo

Figura 5.19 – Número de células positivas para PCNA por campo avaliado encontradas em ambas as condições experimentais e controle positivo

A figura 5.20 mostra os resultados obtidos pelo ensaio TUNEL para visualização de apoptose celular. Os número de células em apoptose é baixo para ambos os grupos experimentais e controle positivo. Para facilitar a identificação, em todas as micrografias apresentadas na figura 5.20, as células positivas para o ensaio de TUNEL são apontadas com uma seta.

Figura 5.20 – Células apoptóticas determinadas pelo ensaio de TUNEL.

A figura 5.21 mostra o efeito das injeções de tetraciclina sobre os implantes. É possível visualizar 4 linhas longitudinais no controle positivo (micrografia localizada à esquerda da linha Controles) e nenhuma no controle negativo (micrografia localizada à direita da linha Controles). Em ambos os *scaffolds* é possível somente uma linha.

Figura 5.21 – Efeito das injeções de tetraciclina na deposição de tecido mineralizado. O controle a esquerda é o incisivo central inferior de um camundongo e o localizado a direita uma raiz injetada com SHED em RADA-16 e implantada em camundongo que não recebeu as injeções

6 DISCUSSÃO

A engenharia tecidual é um campo de pesquisa aplicada promissora no estágio atual do conhecimento humano, que tem por meta desenvolver estratégias e material biológico para recompor estruturas danificadas ou perdidas e pesquisadores de todos os segmentos se voltam em sua direção. O paradigma da transdisciplinaridade tem na engenharia tecidual um de seus mais vívidos exemplos, pois ela só prospera pela integração de princípios, métodos e conhecimentos dos campos da química, física, engenharia, biologia entre outros (18).

A hipótese desse estudo foi aceita uma vez que os resultados mostram que SHED quando injetadas em canais radiculares de pré-molares humanos com ápice aberto são capazes de dar origem a um tecido pulpar funcional *in vivo*.

Sabe-se que SHED é capaz de formar tecido pulpar, se diferenciar em odontoblastos (14, 16, 155) capazes de promover deposição de dentina *in vivo* (14). Entretanto esse trabalho possui três importantes diferenciais que podem aproximar os princípios da engenharia de tecidos à prática endodôntica.

O primeiro é o uso de remanescentes radiculares com dimensões que mais se assemelham com as naturalmente encontradas em dentes permanentes jovens. Não há relato de que, usando SHED, seja possível regenerar o complexo dentino-pulpar em estruturas com espessuras superiores a 1 mm.

O segundo reside na estratégia empregada nesse estudo para entregar SHED no canal radicular. A injeção é largamente utilizada por cirurgiões-dentistas em diversos procedimentos o que torna prática da proposta mais familiar.

Por fim, a escolha do *scaffold* deve atender diversos pré-requisitos dependentes da necessidade criada e do resultado esperado, sob o risco de comprometer a obtenção do tecido desejado (58). *Scaffolds* injetáveis possuem a habilidade de preencher saliências e reentrâncias do canal radicular de forma

passível, sendo capazes de alcançarem a porção apical de raízes curvas e eliminam a necessidade de empregar substâncias solventes, como o clorofórmio, utilizadas para confeccionar *scaffolds* rígidos ^(16, 155, 156).

A primeira etapa desse estudo objetivou avaliar a capacidade de SHED sobreviverem e proliferarem dentro dos *scaffolds*. Uma vez que não foram encontrados relatos na literatura sobre esta capacidade para SHED, tornou-se imprescindível avaliar se os *scaffolds* consistiam em um ambiente amistoso para a sobrevivência. Por ser desejo desse trabalho a regeneração pulpar na extensão dos canais radiculares, também era necessário ter a certeza que os *scaffolds* fossem capazes de manter arquitetura tridimensional e que as células conseguissem se proliferar interconectadas em todos seus volumes.

A figura 5.1 mostra que ambos os *scaffolds* forneceram um ambiente propício a sobrevivência e multiplicação celular. As curvas de crescimento obtidas apresentam um padrão bimodal: um primeiro momento um crescimento mais lento com um tempo necessário para dobrar a população de três dias seguido de um momento com velocidade de crescimento mais acentuada, onde a população de célula aproximadamente dobrava a cada dois dias. O primeiro momento deve-se a grande distância observada entre os corpos celulares logo que estes são ressuspensos no *scaffold* e injetados nos poços (concentração de 10×10^4 células/mL). A partir do terceiro dia, quando a distância entre as células é menor e estas compartilham sinais indutivos com maior intensidade, a velocidade de multiplicação tende a crescer. Tal fenômeno não se trata somente de um artefato do seguinte raciocínio: uma vez que a partir do terceiro dia existem mais células, é esperado uma velocidade maior no aumento de seus números. A negativa para essa ideia se baseia na observação de que ao se cultivar um dado número de células em placas com diâmetros diferentes, se atinge a confluência mais rápido na de menor dimensão, devido a maior concentração de células por unidade de área ¹². É plausível que o mesmo aconteça com as SHED nos *scaffolds* utilizados.

¹² Dados não apresentados neste trabalho

Embora o método de contagem visual empregado seja um susceptível à falhas induzidas tanto pelo preparo das células quanto pelo erro inerente ao operador, esse se mostrou o método mais indicado. O uso de reagente WST-I foi aventado mas não pode ser levado adiante porque leitor de microplacas ELISA não conseguia realizar medidas precisas e confiáveis devido a interferência promovida pelos géis de *scaffold* no feixe laser. O uso de sulforodamina B (SRB) foi descartado devido impossibilidade de manter os *scaffolds* íntegro e em posição depois das lavagens necessárias.

A habilidade dos *scaffolds* de apresentarem estruturas tridimensionais é destacada na figura 6.1 onde é mostrado um poro na superfície do RADA-16 três dias após este ser injetado em um poço da placa. Deve-se ainda lembrar que a essa altura, três trocas de meio já haviam sido realizadas e ainda assim o poro manteve-se em posição.

Figura 6.1 – Poro na superfície de RADA-16 injetado em um poço de placa de 96 poços após três dias imerso em meio de cultura

A capacidade das SHED de se proliferarem nos volumes obtidos pode ser visualizada nas figuras 5.2 e 5.3. Após sete dias, as células apresentam um formato alongado e com intenso contato, contrastando e muito com a forma esférica e distribuição esparsa observada após 1 dia de cultura. Essas imagens juntamente com os dados obtidos em 5.1 mostraram que os *scaffolds* a base de

RADA-16 e rhC-I consistem em um ambiente saudável, permitindo a difusão de nutrientes e o crescimento e migração das células em seus interiores.

A próxima etapa foi realizada para avaliar a capacidade de SHED sobreviverem, proliferarem e se diferenciarem em odontoblastos quando injetadas em canal radicular.

A primeira observação a ser feita é relacionada a injetabilidade dos *scaffolds*. Embora células já tivessem sido ressuspensas e os *scaffolds* injetados nos poços e placas para executar a parte anteriormente discutida, foi nesse momento, em que a necessidade de injeção em canal radicular, que os materiais e seus *modus operandi* foram melhor observados.

Uma constatação prática é que o RADA-16 é um *scaffold* de uso mais amistoso do que o a base de rhC-I. Isso se deve ao fato de que uma vez diluído em sucrose na concentração desejada procede-se com a ressuspensão das células seguido da injeção. No caso do rhC-I, após o preparo dos oligômeros, é preciso misturar rapidamente os cinco componentes em ordem pré-estabelecida (seção 4.2) tentando evitar a incorporação de bolhas de ar no gel obtido. Além disso, o gel de rhC-I é mais viscoso do que o obtido com RADA-16. Embora isso não tenha impedido a injeção do rhC-I no pequeno espaço do canal radicular, exigiu o uso de uma ponteira grande (1000 µL) o que diminui a capacidade do operador em controlar o ritmo da injeção desse *scaffold* no canal radicular.

Quando injetadas com uso de ambos os *scaffolds* no interior dos canais radiculares, SHED expressam os marcadores sugestivos de diferenciação odontoblástica conforme observado na figura 5.4. O aumento de expressão gênica *in vitro* de DMP-1, DSPP e MEPE já havia sido reportada anteriormente quando *scaffolds* rígidos (a base de PLLA) contendo SHED foram inseridos em discos de dentina (1 mm de espessura) e mantidos em cultura pelo mesmo intervalo de tempo desse estudo (28 dias) ⁽¹⁵⁵⁾. Em todos os grupos controles, onde SHED ressuspensas nos *scaffolds* não tiveram contato com dentina, não observou-se aumento da expressão gênica como previamente demonstrado no mesmo estudo ⁽¹⁵⁵⁾. Isso reforça a conceito a dentina e suas proteínas derivadas,

como a BMP-2 e mais modestamente BMP-7, consistem em elementos fundamentais para a indução de diferenciação odontoblástica de SHED ⁽¹⁵⁵⁾.

O aumento da expressão gênica se inicia antes em RADA-16 comparado a rhC-I. Em sete dias é possível visualizar bandas, ainda que fracas, para DSPP e MEPE em RADA-16, mas não em rhC-I. Ao final de 14 dias é possível perceber que as bandas estão mais fortes para estes dois genes em RADA-16 e que bandas mais suaves são observadas para rhC-I nesse período. A partir da terceira semana a expressão de DMP-1 começa a ser observada para ambos os *scaffolds* mas mais pronunciadamente para RADA-16. Ao final dos 28 dias, SHED ressuspendidas em ambos os *scaffolds* expressam os genes DSPP, DMP-1 e MEPE. Embora as bandas para DMP-1, DSPP e MEPE do grupo experimental para rhC-I não são tão fortes do que as encontradas em RADA-16 ao final do período, cabe ressaltar que as bandas referentes ao GAPDH também estão enfraquecido. Dessa maneira é possível sugerir que para essa análise menos células foram obtidas nos canais, mas que as obtidas apresentavam um nível de expressão gênica bastante elevado.

A diferença encontrada na intensidade da expressão dos genes de SHED nos diferentes *scaffolds* pode ser explicada devido a diferença da viscosidade dos materiais. É possível que em rhC-I, por ser mais viscoso que RADA-16, as células encontrem mais dificuldades nos períodos iniciais para migrarem para a dentina e estabelecer contatos que aumentem a troca de sinais indutivos que estimulem a diferenciação odontoblástica.

Visto que SHED são capazes de proliferar e expressarem marcadores sugestivos de diferenciação odontoblástica quando injetadas com ambos os *scaffolds* em canais radiculares *in vitro*, o estudo evoluiu para a etapa *in vivo* para confirmar a hipótese deste estudo.

As figuras 5.5 e 5.6 mostram a formação de um tecido na extensão das estruturas implantadas em que *scaffold* foi injetado com SHED, confirmando uma expectativa de reproduzir em canais radiculares os resultados obtidos em estudos anteriores ^(14, 16, 155). Uma observação feliz foi a de que em nenhum dos

controles (em que os *scaffolds* foram injetados sem células) foi observada a presença de tecidos no interior dos canais, o que de uma maneira, não muito contundente, sugere que os tecidos obtidos nos grupos com SHED não eram oriundos dos tecidos dos camundongos.

Para confirmar que a origem do tecido era de fato as SHED injetadas nos canais radiculares, procedeu-se com a transdução destas células com shRNA para GFP conforme apresentado nas figuras 5.14 e 5.15. A análise imunohistoquímica obtida após a retirada dos implantes com essas células é apresentada na figura 5.16. Os tecidos obtidos com o uso de ambos os *scaffolds* apresenta-se positivo para o anti-corpo anti-GFP empregado, o que não aconteceu com o Controle - (pré-molar humano extraído). Esse resultado possui grande importância no desenvolvimento do trabalho uma vez que fornece uma evidência de que o tecido obtido provém das SHED.

A coleção de micrografias apresentadas da figura 5.7 até 5.11 mostra as polpas obtidas com ambos os *scaffolds* nos canais radiculares. Percebe-se que morfológicamente o tecido formado possui características de um tecido conjuntivo frouxo, com um adensamento celular rente a parede dentinária e presença de grande número de células similares a fibroblastos na luz do canal. O tecido é saudável, não são observadas áreas hiperêmicas nem de exudato inflamatório.

A densidade microvascular obtida foi semelhante para ambos os *scaffolds* e Controle + (pré-molar humano extraído) é apresentada na figura 5.12. Análise imunohistoquímica realizada para detecção de Fator VIII (Figura 5.17) mostra as células endoteliais dos vasos coradas de vermelho tanto nos tecidos obtidos com uso de SHED e *scaffolds* injetáveis quanto no Controle +, indicando a presença de uma rede vascular madura na polpa formada. Interessantemente, na cirurgia para retirada dos implantes é possível observar vasos sanguíneos dos camundongos adentrando o canal radicular (Figura 6.2). São esses vasos os responsáveis pela nutrição das células num primeiro momento e espera-se

que eles se anastomosem com o sistema vascular formado a partir de SHED a partir do momento em que o tecido pulpar se forma ⁽¹⁶⁾.

Figura 6.2 – Vasos sanguíneos do camundongo penetrando a luz do canal radicular contendo SHED em RADA-16

Comparando-se os tecidos obtidos com SHED e *scaffolds* injetáveis ao Controle + (pré-molar humano extraído) nota-se que o último possui uma densidade de fibras colágenas na luz do canal bastante superior (Figuras 5.8 e 5.9). Essa diferença não causa surpresa uma vez que compara-se um tecido com 35 dias de formação com uma polpa dental madura. A baixa ocorrência de fibras colágenas nos tecidos formados é similar a obtida em outro estudo ⁽¹⁴⁾.

As polpas obtidas com SHED apresentam um adensamento celular junto à parede dentinária que sugere a obtenção de uma camada odontoblástica. (Figura 5.11). Em geral, as camadas obtidas para RADA-16 se apresentaram mais organizadas e com menos soluções de continuidade do que as obtidas com rhC-I. A possível explicação para isso reside novamente na maior viscosidade do *scaffold* a base de rhC-I. Como proposto para explicar a menor expressão dos genes nos primeiros 14 dias dentro dos canais na etapa *in vitro*, a maior viscosidade pode resultar em maior dificuldade das células migrarem pela estrutura do *scaffold* e a uma formação mais tardia da camada odontoblástica. De toda forma, a contagem das células imediatas à dentina (Figura 5.13)

mostrou não haver diferença entre o número de células para nenhum dos grupos avaliados. Isso faz com que a crítica subjetiva da desorganização da camada de rhC-I seja balanceada pelo número igual de células contadas em todas as situações apresentadas.

A homeostase celular e tecidual é também regulada pelo equilíbrio entre os processos proliferativos e apoptóticos, os quais foram avaliados por imunohistoquímica.

Células proliferativas foram identificadas pela expressão de PCNA, originalmente identificado como um gene expressado no núcleo de células durante a síntese de DNA ⁽¹⁵⁷⁾. A figura 5.18 mostra que o padrão de proliferação celular nas polpas obtidas é semelhante ao naturalmente encontrado em um pré-molar humano jovem. A quantificação das células que expressaram PCNA (Figura 5.19) mostrou que o tecido obtido com SHED apresenta um nível de proliferação similar ao encontrado no Controle +.

Uma das características de células apoptóticas é a degradação do DNA após a ativação de endonucleases Ca/Mg dependentes, resultando em clivagem das fitas de DNA. O ensaio de TUNEL aponta as células apoptóticas *in situ* identificando células com DNA fragmentado por reação do tipo antígeno-anticorpo. A figura 5.20 apresenta regiões onde células apoptóticas foram identificadas pela coloração do núcleo. Não foi possível quantificar o número de células apoptóticas porque em muitos dos campos observados estas não foram detectadas e a procura por campos com células apoptóticas para viabilizar a contagem determinaria o fim da randomização empregada até esse momento em todo o estudo.

Os níveis de proliferação e apoptose obtidos nos tecidos formados são semelhantes aos naturalmente encontrados no pré-molar humano controle. Essa harmonia sugere que a polpa dental obtida com células-tronco possui homeostase celular e tecidual.

Das funções biológicas da polpa dental, nutritiva, sensorial e defensiva, a produção de dentina por toda a vida é a função *mater*. O aglomeramento celular

nessa região não poderia ser caracterizado como camada odontoblástica se as células não fossem capazes de produzir dentina. A figura 5.21 fornece evidências que o tecido formado com SHED em ambos os *scaffolds* é capaz de depositar dentina ao longo das paredes dentinárias.

Embora quatro injeções de tetraciclina tenham sido administradas (conforme visualizado no Controle mostrado a esquerda na Figura 5.21), somente uma linha foi obtida nas duas condições experimentais, contrastando com relato anteriormente publicado ⁽¹⁴⁾. A linha fluorescente observada corresponde a injeção de tetraciclina administrada 25 dias após a implantação da raiz no dorso do camundongo. Isso sugere que as células quando injetadas em uma estrutura com dimensões mais semelhantes à raiz dental, demoram mais para se organizarem em um tecido de fato funcional do que quando em discos de dentina ⁽¹⁴⁾. A única linha observada para rhC-I e RADA-16 mostra que o início da deposição de dentina se dá necessariamente entre os dias 20 e 25. Os resultados do RT-PCR (Figura 5.4) sugerem que é a partir do dia 21 que as células apresentam níveis de expressão gênica sugestiva de diferenciação odontoblástica mais acentuados. Essas duas observações reforçam a ideia de que, um tempo maior é necessário para que as SHED injetadas nos canais radiculares sejam diferenciadas o suficiente para depositar dentina.

Nos dez dias entre a última injeção de tetraciclina e a recuperação dos implantes, foi observada uma espessura de dentina depositada de aproximadamente 100 μm , aproximadamente 10 μm ao dia. Essa taxa de deposição é bastante superior aos 3,3 μm observados em polpa dental natural presente em um disco de dentina implantado em camundongo ⁽¹⁴⁾. O ritmo três vezes maior pode ser relacionado as distintas fases dos ciclos celulares das células secretoras de matrizes mineralizáveis ^(14, 158). Sugere-se ainda que os odontoblastos originados de SHED possam ser células mais “jovens”, com alta atividade secretória, comparados aos odontoblastos naturalmente presentes nos tecidos naturais ⁽¹⁴⁾.

7 CONCLUSÕES

O emprego da engenharia de tecidos para a obtenção de uma polpa dental que permita a completa a formação dos tecidos e anexos radiculares é uma estratégia que tem sido estudada afim de se reduzir a perda prematura de dentes permanentes jovens. Esse trabalho apresenta evidências de que SHED, quando injetadas em canais radiculares de pré-molares humanos com ápice aberto, são capazes de dar origem a um tecido pulpar funcional *in vivo*. Os resultados desse estudo agregam para o desenvolvimento de uma técnica endodôntica que, em casos determinados casos, pode substituir o emprego de materiais sintéticos por uma alternativa capaz de devolver à estrutura dental o tecido que naturalmente a compõe.

REFERÊNCIAS¹³

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2007.
2. Petersson EE, Andersson L, Sorensen S. Traumatic oral vs non-oral injuries. *Swed Dent J*. 1997;21(1-2):55-68.
3. Glendor U, Andersson L. Public health aspects of oral diseases and disorders: Dental trauma. In: Pine C, Harris R, editors. *Community oral health*. London: Quintessence Publishing; 2007. p. 203–14.
4. Andreasen JO, Ravn JJ. Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a danish population sample. *Int J Oral Surg*. 1972;1(5):235-9.
5. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*. 1996;12(6):865-8.
6. Nor JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent*. 2006;31(6):633-42.
7. Bhasker SN. *Orban's oral histology and embryology*. 11 ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1991.
8. Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares: Principios técnicos e biológicos* 4ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
9. Rafter M. Apexification: A review. *Dent Traumatol*. 2005;21(1):1-8.
10. Morse DR, O'Larnic J, Yesilsoy C. Apexification: Review of the literature. *Quintessence Int*. 1990;21(7):589-98.
11. JOE Editorial Board. Uses of calcium hydroxide: An online study guide. *J Endod*. 2008;34(5 Suppl):e87-92.
12. Webber RT. Apexogenesis versus apexification. *Dent Clin North Am*. 1984;28(4):669-97.
13. Fellippe MCS. Efeito de trocas da pasta de hidróxido de cálcio sobre os processos de apicificação e de reparo periapical de dentes de cães com

¹³ De acordo com o Estilo Vancouver

rizogênese incompleta [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

14. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado M, Shi S, et al. Shed differentiate into functional odontoblast and endothelium. *J Dent Res*. 2010.
15. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived bmp-2 and odontoblastic differentiation of shed. *J Dent Res*. 2009.
16. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
17. Majumdar SK. History of dentistry: An overview. *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad*. 2002;32(1):31-42.
18. Nor JE, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*. 2001;81(4):453-63.
19. Hohlfield J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N, Chaubert P, Gerber S, Scaletta C, et al. Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns. *Lancet*. 2005;366(9488):840-2.
20. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004;364(9436):766-70.
21. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999;284(5413):489-93.
22. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100(2):297-302.
23. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(1):94-100.
24. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):154-63.
25. Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S, Ishikawa I. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2

to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 1997;68(2):103-9.

26. Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2069-75.

27. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol.* 1990;35(7):493-7.

28. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1991;70(3):171-5.

29. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (bmp)-2 and -4. *J Dent Res.* 1994;73(9):1515-22.

30. Rutherford RB. Bmp-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2001;109(6):422-4.

31. Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating fgf-4 gene. *Int J Dev Biol.* 1994;38(3):463-9.

32. Vaahtokari A, Aberg T, Jernvall J, Keranen S, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev.* 1996;54(1):39-43.

33. Chen H, Tang Z, Liu J, Sun K, Chang SR, Peters MC, et al. Acellular synthesis of a human enamel-like microstructure. *Adv Mater.* 2006;18(14):1846-51.

34. Iijima M, Moriwaki Y, Wen HB, Fincham AG, Moradian-Oldak J. Elongated growth of octacalcium phosphate crystals in recombinant amelogenin gels under controlled ionic flow. *J Dent Res.* 2002;81(1):69-73.

35. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (vegf)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999;154(2):375-84.

36. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. Shed: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.

37. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13475-80.
38. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*. 2004;83(7):523-8.
39. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*. 2002;81(10):695-700.
40. Modino SA, Sharpe PT. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol*. 2005;50(2):255-8.
41. Huang G, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan R, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2009.
42. Langer R, Vacanti JP. Artificial organs. *Sci Am*. 1995;273(3):130-3.
43. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2003;21(9):1025-32.
44. van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science*. 2000;287(5457):1439-41.
45. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S336-44.
46. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: Growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res*. 2005;15(5):301-16.
47. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-41.
48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
49. Kloostergaard L. Embryonic stem cell research is not dehumanising us. *J Med Ethics*. 2009;35(12):774-7.

50. Evans M. Crossing the line? As obama clears path for embryonic stem-cell research, catholic healthcare finds itself at crossroads of religion and medicine. *Mod Healthc.* 2009;39(11):6-7.
51. Diniz D. Embryonic stem cell research: Ethical challenges for developing world bioethics. *Dev World Bioeth.* 2008;8(3):2-4.
52. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (dpSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.
53. Casagrande L, Mattiella LG, Araujo FB, Nor JE. Stem cells in dental practice: Perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;31(1):25-7.
54. Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.* 1992;37(11):945-52.
55. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992;37(12):1045-55.
56. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 1994;162(1):18-28.
57. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.
58. Putnam AJ, Mooney DJ. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat Med.* 1996;2(7):824-6.
59. Xu HH, Weir MD, Simon CG. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. *Dent Mater.* 2008;24(9):1212-22. .
60. Zhang W, Walboomers XF, van Osch GJ, van den Dolder J, Jansen JA. Hard tissue formation in a porous ha/tcp ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(2):285-94.
61. Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res.* 2003;82(11):903-8.

62. Leong NL, Jiang J, Lu HH. Polymer-ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2006;1:2651-4.
63. Khan Y, El-Amin SF, Laurencin CT. In vitro and in vivo evaluation of a novel polymer-ceramic composite scaffold for bone tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2006;1:529-30.
64. Jiang T, Abdel-Fattah WI, Laurencin CT. In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(28):4894-903.
65. Vogelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(6):1323-31.
66. Burkoth AK, Burdick J, Anseth KS. Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior. *J Biomed Mater Res.* 2000;51(3):352-9.
67. Klouda L, Vaz CM, Mol A, Baaijens FP, Bouten CV. Effect of biomimetic conditions on mechanical and structural integrity of pga/p4hb and electrospun pcl scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(3):1137-44.
68. Borzacchiello A, Mayol L, Ramires PA, Pastorello A, Di Bartolo C, Ambrosio L, et al. Structural and rheological characterization of hyaluronic acid-based scaffolds for adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2007;28(30):4399-408.
69. Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1995;1(1):3-13.
70. Patrick CW, Jr., Chauvin PB, Hobley J, Reece GP. Preadipocyte seeded plga scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng.* 1999;5(2):139-51.
71. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):3-12.
72. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res.* 1998;42(3):396-402.
73. Gelain F, Horii A, Zhang S. Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-d tissue cell cultures and regenerative medicine. *Macromol Biosci.* 2007;7(5):544-51.

74. 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;97(12):6728-33.
75. Zhang S, Altman M. Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering. *React Funct Polym*. 1999;41(1-3):91-102.
76. Cui H, Webber MJ, Stupp SI. Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials. *Pept Sci*. 2010;94(1):1-18.
77. Tsonchev S, Schatz GC, Ratner MA. Hydrophobically-driven self-assembly: A geometric packing analysis. *Nano Lett*. 2003;3(5):623-6.
78. Zhang S, Lockshin C, Herbert A, Winter E, Rich A. Zuotin, a putative z-DNA binding protein in *saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1992;11(10):3787-96.
79. Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3334-8.
80. Cui H, Muraoka T, Cheetham AG, S I Stupp. Self-assembly of giant peptide nanobelts. *Nano Lett*. 2009;9(3):945-51.
81. 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.
82. Zhang S, Ellis-Behnke R, Zhao X, Spirio L. Puramatrix: Self-assembling peptide nanofiber scaffolds. In: Ma PX, Elisseeff JH, editors. *Scaffolding in tissue engineering*. Boca Raton: RC Press; 2005. p. 217-38.
83. ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices - part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization. 2007.
84. ISO 10993-4. Biological evaluation of medical devices - part 4: Selection of tests for interactions with blood. International Standards Organization. 2002.
85. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
86. Erickson IE, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, Mauck RL. Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(5):1041-52.

87. Spencer NJ, Cotanche DA, Klapperich CM. Peptide- and collagen-based hydrogel substrates for in vitro culture of chick cochleae. *Biomaterials*. 2008;29(8):1028-42.
88. 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;1187(1):42-51.
89. Ellis-Behnke RG, Liang YX, You SW, Tay DK, Zhang S, So KF, et al. Nano neuro knitting: Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):5054-9.
90. Misawa H, Kobayashi N, Soto-Gutierrez A, Chen Y, Yoshida A, Rivas-Carrillo JD, et al. Puramatrix facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice. *Cell Transplant*. 2006;15(10):903-10.
91. Cao F, Sadrzadeh Rafie AH, Abilez OJ, Wang H, Blundo JT, Pruitt B, et al. In vivo imaging and evaluation of different biomatrices for improvement of stem cell survival. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(6):465-8.
92. Kishimoto N, Momota Y, Mori R, Hashimoto Y, Iami K, Omasa T, et al. Bone regeneration using dedifferentiated fat cells with puramatrix. *J Oral Tissue Engin*. 2008;6(2):127-34.
93. Davis ME, Motion JP, Narmoneva DA, Takahashi T, Hakuno D, Kamm RD, et al. Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells. *Circulation*. 2005;111(4):442-50.
94. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986;231(4736):397-400.
95. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999;284:(5413):489-93.
96. Moldovan NI, Ferrari M. Prospects for microtechnology and nanotechnology in bioengineering of replacement microvessels. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):320-4.
97. Vogel V, Baneyx G. The tissue engineering puzzle: A molecular perspective. *Annu Rev Biomed Eng*. 2003;5(1):441-63.
98. World Health Organization. The world health report : Report of the director-general. Geneva: World Health Organization; 1995. p. v.

99. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(3):654-61.
100. Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Tomita S, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg.* 1999;68(6):2074-80; discussion 80-1.
101. Davis ME, Hsieh PC, Takahashi T, Song Q, Zhang S, Kamm RD, et al. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (igf-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(21):8155-60.
102. Eyre DR. Collagen: Molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science.* 1980;207(4437):1315-22.
103. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001;221(1-2):1-22.
104. Brodsky B, Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 1997;15(8-9):545-54.
105. Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs.* 2004;18(2):103-19.
106. Kivirikko KI. Collagen biosynthesis: A mini-review cluster. *Matrix Biol.* 1998;16(7):355-6.
107. Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen TM, Myllyla R, Kivirikko KI. Studies on the lysyl hydroxylase reaction. II. Inhibition kinetics and the reaction mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1980;611(1):51-60.
108. Heikkinen J, Risteli M, Wang C, Latvala J, Rossi M, Valtavaara M, et al. Lysyl hydroxylase 3 is a multifunctional protein possessing collagen glucosyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36158-63.
109. Csiszar K. Lysyl oxidases: A novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:1-32.
110. Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5(3):206-10.
111. Asher DM. The transmissible spongiform encephalopathy agents: Concerns and responses of united states regulatory agencies in maintaining the safety of biologics. *Dev Biol Stand.* 1999;100:103-18.

112. Bulleid NJ, John DC, Kadler KE. Recombinant expression systems for the production of collagen. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(4):350-3.
113. Myllyharju J, Nokelainen M, Vuorela A, Kivirikko KI. Expression of recombinant human type i-iii collagens in the yeast *pichia pastoris*. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(4):353-7.
114. Ahtikoski A. Synthesis and degradation of muscle collagen during immobilization, glucocorticoid treatment and in neuromuscular diseases. Oulu: University of Oulu; 2003.
115. Ala-Kokko L, Hyland J, Smith C, Kivirikko KI, Jimenez SA, Prockop DJ. Expression of a human cartilage procollagen gene (col2a1) in mouse 3t3 cells. *J Biol Chem.* 1991;266(22):14175-8.
116. Geddis AE, Prockop DJ. Expression of human col1a1 gene in stably transfected ht1080 cells: The production of a thermostable homotrimer of type i collagen in a recombinant system. *Matrix.* 1993;13(5):399-405.
117. Myllyharju J, Lamberg A, Notbohm H, Fietzek PP, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Expression of wild-type and modified proalpha chains of human type i procollagen in insect cells leads to the formation of stable $[\alpha 1(i)]_2\alpha 2(i)$ collagen heterotrimers and $[\alpha 1(i)]_3$ homotrimers but not $[\alpha 2(i)]_3$ homotrimers. *J Biol Chem.* 1997;272(35):21824-30.
118. Veijola J, Koivunen P, Annunen P, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Cloning, baculovirus expression, and characterization of the alpha subunit of prolyl 4-hydroxylase from the nematode *caenorhabditis elegans*. This alpha subunit forms an active alpha beta dimer with the human protein disulfide isomerase/beta subunit. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26746-53.
119. Vaughn PR, Galanis M, Richards KM, Tebb TA, Ramshaw JA, Werkmeister JA. Production of recombinant hydroxylated human type iii collagen fragment in *saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* 1998;17(6):511-8.
120. Nokelainen M, Tu H, Vuorela A, Notbohm H, Kivirikko KI, Myllyharju J. High-level production of human type i collagen in the yeast *pichia pastoris*. *Yeast.* 2001;18(9):797-806.
121. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type iii procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol.* 2003;21(1):52-6.

122. Yang C, Bodo M, Chang R. Development of recombinant gelatin by expression of recombinant collagen in yeast and plants. American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition; New Orleans 1999.
123. Merle C, Perret S, Lacour T, Jonval V, Hudaverdian S, Garrone R, et al. Hydroxylated human homotrimeric collagen i in agrobacterium tumefaciens-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. FEBS Lett. 2002;515(1-3):114-8.
124. Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. FEBS Lett. 2000;469(1):132-6.
125. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast pichia pastoris. FEMS Microbiol Rev. 2000;24(1):45-66.
126. Vuorela A, Myllyharju J, Nissi R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type iii collagen in the yeast pichia pastoris: Formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase. EMBO J. 1997;16(22):6702-12.
127. Schrieber R, Seybold U. Gelatine production, the six steps to maximum safety. Dev Biol Stand. 1993;80:195-8.
128. Hellman KB, Honstead JP, Vincent CK. Adventitious agents from animal-derived raw materials and production systems. Dev Biol Stand. 1996;88:231-4.
129. Suzuki K. Collagen derived from a porcine skin. Fragrance J. 2001;29(11):59-64.
130. Tuderman L, Prockop DJ. Procollagen n-proteinase. Properties of the enzyme purified from chick embryo tendons. Eur J Biochem. 1982;125(3):545-9.
131. Kenyon K, Modi WS, Contente S, Friedman RM. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. J Biol Chem. 1993;268(25):18435-7.
132. Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. High-yield secretion of recombinant gelatins by pichia pastoris. Yeast. 1999;15(11):1087-96.
133. Werten MW, Wisselink WH, Jansen-van den Bosch TJ, de Bruin EC, de Wolf FA. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in pichia pastoris. Protein Eng. 2001;14(6):447-54.

134. Wikipedia. Fed-batch. 2010 [30/03/2010]; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fed-batch>.
135. Olsen D, Yang C, Bodo M, Chang R, Leigh S, Baez J, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1547-67.
136. Nimni ME. Collagen: Structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 1983;13(1):1-86.
137. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: Facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
138. Cornell CN, Lane JM, Chapman M, Merkow R, Seligson D, Henry S, et al. Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma.* 1991;5(1):1-8.
139. Walsh WR, Harrison J, Loeffler A, Martin T, Van Sickle D, Brown MK, et al. Mechanical and histologic evaluation of collagraft in an ovine lumbar fusion model. *Clin Orthop Relat Res.* 2000(375):258-66.
140. Akamaru T, Suh D, Boden SD, Kim HS, Minamide A, Louis-Ugbo J. Simple carrier matrix modifications can enhance delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for posterolateral spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(5):429-34.
141. Burkus JK, Dorchak JD, Sanders DL. Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(4):372-7.
142. Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem.* 1990;185(1):131-5.
143. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials.* 1996;17(7):679-84.
144. Pereira HLA, Ribeiro SLE, Ciconelli RM. Tratamento com antiinflamatórios tópicos na osteoartrite de joelho. *Rev Bras Reumatol.* 2006;43(3):188-93.
145. Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: An update. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391(Supplement 1):337-48.
146. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Prevention of corneal ulceration in the developing world. *Int Ophthalmol Clin.* 2002;42(1):71-7.

147. Li F, Carlsson D, Lohmann C, Suuronen E, Vascotto S, Kobuch K, et al. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15346-51.
148. Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, Fagerholm P, Lagali N, Watsky MA, et al. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1869-75.
149. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71(2):343-54.
150. Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR, Dravida S, Lagali N, Shinozaki N, et al. Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: Performance of type i versus type iii collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3887-94.
151. Lagali N, Griffith M, Fagerholm P, Merrett K, Huynh M, Munger R. Innervation of tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes: A comparative in vivo confocal microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3895-902.
152. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials*. 2008;29(9):1147-58.
153. Liu Y, Griffith M, Watsky MA, Forrester JV, Kuffova L, Grant D, et al. Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2006;7(6):1819-28.
154. Masatomi Y, Nakagawa Y, Kanamoto Y, Sobue S, Ooshima T. Effects of serum phosphate level on formation of incisor dentine in hypophosphatemic mice. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(4):182-7.
155. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentine-derived bmp-2 and odontoblastic differentiation of shed. *J Dent Res*. 2010;89(6):603-8.
156. Huang G, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan R, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-15.
157. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, et al. PcnA and ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol*. 1992;45(5):416-9.

158. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13(2):151-7.

ANEXO A – Aprovação obtida pelo *University of Michigan on Use and Care of Animals* para realização deste estudo

THE UNIVERSITY OF MICHIGAN
UNIVERSITY COMMITTEE ON USE
AND CARE OF ANIMALS (UCUCA)

ROOM 302 ANIMAL RESEARCH FACILITY
ANN ARBOR, MICHIGAN 48106-0614
TELEPHONE: 734/763-4828 FAX: 734/763-3234
EMAIL: ucucacoffice@umich.edu

4/28/2010

Dr. Jacques Nor
School of Dentistry
University of Michigan

Dear Dr. Nor:

The University of Michigan Committee on Use and Care of Animals (UCUCA) has reviewed your application to use vertebrate animals referenced below. This project has been approved. The proposed animal use procedures are in compliance with University guidelines, State and Federal regulations, and the standards of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

When communicating with the UCUCA Office please refer to the approval number referenced below. The appropriate approval number must accompany all requisitions for animals and pharmaceuticals.

The approval period for your approval number is also indicated below. UCUCA approval must be obtained prior to changes from what is originally stated in the protocol. An amendment must be submitted to the UCUCA for review and approved prior to the implementation of the proposed change.

The University's Animal Welfare Assurance Number on file with the NIH Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) is A3114-01, and most recent date of accreditation by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC, Intl.) is March 10, 2008.

If you receive news media inquiries concerning any aspect of animal use or care in this project, please contact James Erickson, News and Information Services, 647-1842. If you have security concerns regarding the animals or animal facilities, contact Bill Bess, Director of Public Safety, 763-3434.

In addition, Vinicius Rosa is an approved personnel member for this protocol, 09546.

Sincerely,

Dr. Bethany Moore
Associate Professor and Chairperson,
University Committee on Use and Care of Animals

TITLE: DEVELOPMENT OF A NOVEL MODEL FOR THE
ENGINEERING OF THE DENTAL PULP TISSUE
APPROVAL PERIOD: 7/27/2007 TO 7/27/2010
FUNDING AGENCY: NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
UCUCA APPROVAL NUMBER: 09546