LUIZ HENRIQUE SANTOS SILVA

Expressão gênica de moléculas da matriz extracelular e da membrana celular durante a diferenciação de células-tronco adultas de polpa dentária humana

São Paulo

2014

LUIZ HENRIQUE SANTOS SILVA

Expressão gênica de moléculas da matriz extracelular e da membrana celular durante a diferenciação de células-tronco adultas de polpa dentária humana

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Luis Henrique Santos.
Expressão gênica de moléculas da matriz extracelular e da membrana celular durante a diferenciação de células-tronco adultas da polpa dentária humana / Luis Henrique Santos Silva ; orientador Katiúcia Batista da Silva Paiva. -- São Paulo, 2013.
117 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original

1. Células-tronco. 2. Polpa dentária. 3. Diferenciação celular. 4. Metaloproteinases. 5. Proteínas da membrana. I. Paiva, Katiúcia Batista da Silva. II. Título.

Silva LHS. Expressão Gênica de Moléculas da Matriz Extracelular e da Membrana Celular Durante a Diferenciação de Células-Tronco Adultas de Polpa Dentária Humana. Disssertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Aos meus pais, Lusival e Eunice, que me ensinaram o caminho. Espero estar honrando seus ensinamentos;

À minha noiva, Karina, minha amiga e conselheira. Sua firmeza e confiaça me mantiveram firme. Luz da minha vida;

À todos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus .

Eu gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha orientadora Professora Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva por sua valiosa orientação, conselhos e encorajamento durante o desenvolvimento deste trabalho. E acima de tudo, por ser fonte inspiradora, compartilhando sua dedicação e amor pela ciência.

A Professora Leticia Labriola, do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC), minha eterna gratidão, exemplo de pessoa, em meio a tantos se destaca pela humildade, carisma e por ser excelente professora. Não existiu uma pergunta sem resposta. Não posso deixar de agradecer o espaço cedido em seu laboratório em um momento decisivo de meu projeto.

As alunas de pós-graduação e iniciação cientifica do LMMC Leticia Terra, Ancély, Rosangela, Talita, Tatiana e Aline. Amigas, companheiras desta jornada, obrigado por todos os bons momentos e apoio em outros não tão bons.

A Professora Dra. Daniela Sanches Bassères, do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, meu profundo agradecimento. Obrigado por ter aberto e me acolhido em seu laboratório em um importante momento no final de meu período de experimentação. Aos seu alunos, Aline, Amanda e Edmilson, vocês me receberam e me auxiliaram em várias situações, muito obrigado

Meu sincero agradecimento ao Professor Dr. Pio Colepicolo Neto, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas. Obrigado por comparilhar seu espaço e equipamentos. Um agradecimento especial a todos os seus alunos pelo suporte em diversas situações.

Professora Mari Cleide Sogayar, Coordenadora do Núcleo de Terapia Celular e Molecular - Nucel. Muito obrigado por me receber tão bem e por dividir comigo um pouco de seu conhecimento.

Dra. Maria Fernanda Forni o que dizer, tudo o que eu falar você vai usar contra mim. Brincadeiras a parte, muito obrigado pelos ensinamentos e apoio em diversas situações.

Dr. Marcos Demassi, oráculo, meus sinceros e profundos agradecimentos. Marcos você realmente foi essencial em diversos momentos no período experimental deste trabalho, muito obrigado.

A Dra. Ana Claudia Carreira, minha gratidão e minha admiração.

Zizi, Debora e Sandrinha. Não existem palavras que demonstrem o quanto foram especiais nesta trajetória. Jamais esquecerei minhas grandes amigas.

A todos do Núcleo de Terapia Celular e Molecular. Aline, Tatiana, Erica, Gustavo, Camila Leal, Patricia Kossugue, Fernando Lojudice, Gabriel, Caio, Tati, Adalberto, Thais, Camila, Mariele e Ingrid. Muito obrigado por estes anos de convívio e pela amizade.

À Marluce Mantovani, você é uma pessoa admirável e se tornou um ótimo exemplo a ser seguido. Obrigado por tudo.

Ao laboratório da Prof. Glaucia Mendes Souza, por disponibilizar seu equipamento de quantificação de RNA. Muito obrigado.

Ao laboratório da Prof. Bettina Malnic, obrigado por disponibilizar seu microscópio de fluorescência.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo por ter sido cenário da materialização de um sonho.

À Profa. Dr. Marina Helena Cury Gallottini, Chefe da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação. Obrigado pelo auxílio e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, responsável do laboratório de patologia molecular. Obrigado pela oportunidade e por me receber tão bem em seu laboratório.

À secretaria do Departamento de Estomatologia da Universidade de São Paulo. Zilda e Néia, muito obrigado pelas instruções e apoio.

À todos os funcionários da secretária de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Aos integrantes do Laboratório de Patologia Molecular. Maria Fernanda, obrigado pela companhia e por todas as dicas. Lilia, você foi ótima. Edna e Juvani, muito obrigado pelo apoio técnico e pela amizade. Como eu senti a falta de vocês após minha saída.

À minha amiga, parceira de bancada Nicole Bendini. Realmente foi muito bom trabalhar ao seu lado, espero um dia podermos repetir esta parceria de trabalho e de muitas risadas. Jamais esquecerei, muito obrigado.

Ao Dr. Fábio César Prosdócimi, obrigado professor. Várias conversas, conselhos e as vezes nada, mas que realmente valeram muito a pena.

À Thais e Damares, boslsistas de treinamento técnico. Obrigado pela auxílio e pela amizade.

E a todas as pessoas que me auxiliaram durante esta trajetória.

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes”.

Martin Luther King Jr

RESUMO

Silva LHS. Expressão gênica de moléculas da matriz extracelular e da membrana celular durante a diferenciação de células-tronco adultas de polpa dentária humana [Disssertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Original.

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que tem o potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares *in vitro* e *in vivo*. Estas são encontradas em nichos específicos em muitos órgãos e tecidos adultos, tais como medula óssea, tecido adiposo, músculo, dente, cordão umbilical, pele, cartilagem articular, sendo facilmente isoladas, expandidas e com alta capacidade proliferativa *in vitro*. Além disso, apresentam importantes propriedades tróficas, pois secretam várias moléculas bioativas que apresentam propriedades anti-apoptóticas, imunomodulatórias, angiogênicas, quimioatrativas e anti-cicatrizantes e, ainda, baixa imunogenicidade. Em conjunto, estas características têm despertado grande interesse na sua utilização como uma potencial fonte de células para o reparo e regeneração tecidual de diversos órgãos e tecidos. No dente, as células-tronco mesenquimais podem ser encontradas no ligamento periodontal e na polpa dentária de dentes permanentes e de dentes decíduos, além do folículo dentário e na papila apical durante o desenvolvimento dentário no embrião. Pouco se conhece sobre as moléculas que são secretadas para a matriz extracelular e que estão na interface célula-matriz e estão presentes em vias de transdução de sinais intracelulares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica de enzimas que remodelam a matriz extracelular (metaloproteinases de matriz) e seus inibidores (inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz e RECK) e proteínas da membrana plasmática (caveolina) que participam de vias de sinalização durante a diferenciação celular *in vitro* a partir de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana. Para tanto, utilizamos polpas dentárias humanas provenientes de terceiros molares de indivíduos adultos (18-32 anos) coletadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo entre 2011-2013. A células-tronco foram isoladas destas polpas por digestão mecânica e enzimática (solução de colagenase I

e dispase), cultivadas entre 14-15 dias para a primeira passagem e imunofenotipadas por citometria de fluxo na passagem 4. As células foram induzidas as diferenciações osteogênica e adipogênica pela utilização de meios de cultura específicos suplementados por 28 dias. A avaliação dos níveis de transcritos dos genes das MMPs, TIMPS, RECK e Caveolina-1 foi por PCR em tempo real. Estas células são positivas para o marcadores CD29, CD105, STRO-1, CD44, CD90 negativas os marcadores para CD31, CD45, CD34 e CD14 e são capazes de se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos. Verificamos que as MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14, MMP-25, TIMP-3, TIMP-4 e Caveolina-1 foram diferencialmente expressas durante a diferenciação osteogênica, sendo reguladas positivamente apenas no período de 28 dias pós indução e a TIMP-1 regulada positivamente desde o primeiro dia de indução até 28 dias. A MMP-11 não foi detectada nas DPSCs e nem durante a diferenciação. Assim, concluímos que as MMPs encontradas bem como as TIMP-3 e TIMP-4 não participam dos eventos de diferenciação óssea em DPSCs e são expressas apenas no momento da remodelação da matriz extracelular para a formação óssea. A TIMP-1 pode estar participando de ambos os eventos biológicos e a MMP-11 não participa de nenhum deles.

Palavras-chave: Célula-tronco da polpa dentária. Diferenciação Celular. Metaloproteinases de matriz. Inibidores das Metaloproteinases de matriz. Proteínas da membrana celular.

ABSTRACT

Santos LHS. Gene expression of extracellular matrix and cell membrane molecules during cellular differentiation from human dental pulp stem cells [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Original

Mesenchymal stem cells are multipotent cells that have the potential to differentiate into various cell lineages *in vitro* and *in vivo*. These are found in specific niches in many adult organs and tissues, such as bone marrow, adipose tissue, muscle, tooth, umbilical cord, skin, cartilage, being easily isolated, expanded and high proliferative capacity *in vitro*. Moreover, these cells present important trophic properties because secrete various bioactive molecules that exhibit anti-apoptotic anti-healing, immunomodulatory, angiogenic, and chimioatractive properties and also low immunogenicity. Together, these features have attracted great interest in its use as a potential source of cells for tissue repair and regeneration of various organs and tissues. In tooth , mesenchymal stem cells can be found in the periodontal ligament and dental pulp of permanent and exfoliated deciduous teeth, dental follicle and beyond the apical papilla during tooth development in the embryo. Little is known about the molecules secreted into the extracellular matrix, present at cell-matrix interface and present on intracellular signal transduction. Thus , the aim of this study was to evaluate gene expression profile of extracellular matrix remodeling enzymes (matrix metalloproteinases) and their inhibitors (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases and RECK) and plasma membrane proteins (caveolin) that participate in signaling pathways during cellular differentiation *in vitro* human dental pulp stem cells. Normal human impacted third molars were collected from adults (18-32 years-old) at the University Hospital/University of São Paulo from 2011 to 2013. The stem cells were isolated from these pulps by mechanical and enzymatic digestion solution (collagenase I and dispase), single cells grown 14-15 days for the first passage and immunophenotyping by flow cytometry at passage 4. The cells were induced to osteogenic and adipogenic differentiation by the use of specific culture media supplemented for 28 days. The transcript levels of MMPs, TIMP, RECK, and Caveolin-1 were evaluated by real-time PCR. These cells are positive for CD29, CD105, STRO -1, CD44, and CD90 markers and negative for CD31, CD45, CD34, and CD14 markers and are capable of differentiating into osteoblasts and

adipocytes. We found that MMP- 2, MMP -3, MMP -13, MMP -14, MMP -25, TIMP-3, TIMP-4 and Caveolin-1 were differentially expressed during osteogenic differentiation, being upregulated only at 28 days post-induction and TIMP-1 upregulated from the first day of induction to 28 days. MMP -11 was not detected in DPSCs neither during differentiation. Thus, we conclude that MMPs found as well as TIMP-3 and TIMP-4 did not participate in the events of bone differentiation in DPSCs and are expressed only during the remodeling of the extracellular matrix for bone formation. The TIMP-1 may participate in both biological events and MMP-11 does not participate in any of them.

Palavras-chave: Dental pulp stem cells. Cellular differentiation. Matrix metalloproteinases. Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. Cell membrane proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Representação esquemática das fontes de células-tronco dentais 28

Figura 2.2 - Representação esquemática dos domínios das MMPs 37

Figura 2.3 - Esquema ilustrando a presença de cavéola 49

Figura 4.1 - Fluxo de trabalho 56

Figura 5.1 - Curva de proliferação das DPSCs na passagem 4.....63

Figura 5.2 - Imunofenotipagem das DPSCs na passagem 4. 64

Figura 5.3 - Fotomicrografias das DPSCs sem diferenciação e após a indução das diferenciações óssea e adipogênica 65

Figura 5.4 - Quantificação da secreção da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação óssea em DPSCs 66

Figura 5.5 - Expressão gênica diferencial detectada durante a indução da diferenciação óssea em DPSCs 68

Figura 8.1 - Plano de trabalho para ao projeto de doutorado.....77

Quadro 2.1 - Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos...34

Quadro 2.2 - Efeitos biológicos mediados pela MMPs em situações fisiológica 41

Quadro 2.3 - ..... Classificação, propriedades bioquímicas e atuações biológicas das TIMPs.....44

Quadro 4.1 - Descrição dos anticorpos utilizados em citometria de fluxo 57

Quadro 4.2 - Composição dos meios de indução das diferenciações odontogênica,adipogênica, osteogênica/odontogênica e o tipo de coloraçãoo específica utilizada 59

Quadro 4.3 - Sequências dos primers utilizados e o tamanho do fragmento amplificado (amplicon) 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Informações sobre os pacientes das DPSCs utilizadas neste trabalho 54

Tabela 5.1 - Amplificação dos genes nas DPSCs indiferenciadas 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMs	Desintegrina e Metaloproteinase
ADAM-TS	ADAMs com repetições de trombospondina
AP	Ativador de Proteína
APSCs	Apical Papilla Stem Cells
ASCs	Adult Stem Cells
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMSCs	Bone Marrow Stem Cells
Cav	Caveolina
CD	Cluster of Differentiation
CFU-Fs	Colony-Forming Unit-Fibroblast Cells
DFPCs	Dental Follicle Progenitor Cells
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPSCs	Dental Pulp Pluripotent like Stem Cells
DPSCs	Dental Pulp Stem Cells
DSCs	Dental Stem Cells
DT	Domínio Transmembrana
EGF	Epidermal growth factor
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ESCs	Embrionic Stem Cells
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GMSCs	Gingiva-derived MSCs
GPI	Domínio glicosilfosfatidilinositol
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HLA-G5	Antígeno leucocitário humano G5
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
ICAM	Moléculas de adesão intracelular
IDO	Indoleamina 2, 3-dioxigenase
IDPSCs	Immature Dental Pulp Stem Cells
IL	Interleucina

iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells
ISCT	International Society for Cellular Therapy
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MPs	Metaloproteinases de mamíferos
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
MT-MMP	Metaloproteinases de matriz ancoradas à membrana celular
NCSCs	Neural Crest Stem Cells
NGF	Nerve growth factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDLSCs	Periodontal Ligament Stem Cells
PGE_2	Prostaglandina E_2
PZP	Pregnancy zone protein
RECK	Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs
SBP-DPSCs	Stromal Bone-producing Dental Pulp Stem Cells
SC	Stem Cells
SCAPs	Stem Cells from Apical Papilla
SHEDs	Stem Cells Exfoliated Deciduos Teeth
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
TFPI-2	Tissue factor pathway inhibitor 2
TGB-β	Fator de cescimento transformate beta
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF	Fator tumoral de necrose
TRA	Tumor rejection antigens
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
α-MEM	Alpha Minimum Essential Medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
3 PROPOSIÇÃO 52
4 MATERIAIS E MÉTODOS 53
5 RESULTADOS 63
6 DISCUSSÃO 69
7 CONCLUSÃO 75
8 PERSPECTIVAS FUTURAS 76
REFERÊNCIAS 78
ANEXOS 112

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco são necessárias para o desenvolvimento e homeostase tecidual e estão associadas a doenças. No embrião, células-tronco pluripotentes darão origem a um indivíduo inteiro. Em tecidos-específicos adultos, células-tronco somáticas multipotentes mantêm a homeostase. Em muitos casos, mas nem todos, tumores contêm uma população tipo células-tronco que são resistentes a tratamentos padrão (por exemplo, quimioterapia). Em todos estes casos, as células-tronco compartilham certas propriedades, tais como de auto-renovação e produção de células-filhas que podem se diferenciar em múltiplos tipos celulares. Algumas das questões mais proeminentes no campo da biologia de células-tronco estão na compreensão de como estão células se mantém indiferenciadas e como ocorre o comprometimento com a diferenciação em uma linhagem específica. Desta forma, para o potencial uso terapêutico destas células é necessária a manutenção da auto-renovação *ex vivo* em células manipuladas, a prevenção da transformação celular e o controle da diferenciação no caminho desejado.

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que tem o potencial de se diferenciarem em várias linhagens mesenquimais *in vitro* e *in vivo*. Devido a sua disponibilidade em muitos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, músculo, cavidade oral, e sua alta capacidade proliferativa, as MSCs têm despertado grande interesse como uma potencial fonte de células para o reparo e regeneração tecidual de diversos órgãos e tecidos.

As células-tronco mesenquimais da polpa dentária podem ser encontradas em dentes permanentes e em dentes decíduos e têm sido bastante estudas, sobretudo, para a regeneração dos tecidos dentários.

Para o melhor entendimento da biologia das células-tronco é importante conhecer quais as moléculas são secretadas por elas tanto para a matriz extracelular ou aquelas que permanecem ancoradas a membrana celular. Neste sentido, as metaloproteinases de matriz compõem a maior classe de enzimas que remodelam a matriz extracelular e participam de muitos processo fisiológicos e patológicos, tais como proliferação, migração, diferenciação e apoptose. Além destas, os seus inibidores secretados tanto na matriz extracelular quanto ancorado a membrana celular auxiliam no controle da regulação da atividade enzimática destas

enzimas, assim, atuando no balanço da matriz extracelular. Pouco se conhece sobre a secreção e a função destas enzimas/proteínas no contexto das células-tronco.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica de enzimas que remodelam a matriz extracelular (metaloproteinases de matriz) e seus inibidores (inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz e RECK) e proteína da membrana plasmática (caveolina-1) que participa de vias de sinalização durante a diferenciação celular *in vitro* a partir de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana.

Estas células foram caracterizadas por imunofenotipagem por citometria de fluxo, curva de proliferação, ensaios de diferenciação (osteogênica e adipogênica) e a análise do perfil de expressão de moléculas por PCR em tempo real. Verificamos que estas células tem a habilidade e se diferenciarem nas duas linhagens celulares desejadas e as MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14, MMP-25, TIMP-3, TIMP-4 e Caveolina-1 foram diferencialmente expressas durante a diferenciação osteogênica, sendo reguladas positivamente apenas no período de 28 dias pós indução e a TIMP-1 regulada positivamente desde o primeiro dia de indução até 28 dias. A MMP-11 não foi detectada nas DPSCs e nem durante a diferenciação. Assim, concluímos que as MMPs encontradas bem como as TIMP-3 e TIMP-4 não participam dos eventos de diferenciação óssea em DPSCs e são expressas apenas no momento da remodelação da matriz extracelular para a formação óssea. A TIMP-1 pode estar participando de ambos os eventos biológicos e a MMP-11 não participa de nenhum deles.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco ("Stem Cells" – SC) são definidas como células indiferenciadas com capacidade de se auto-renovar (geração de células-filhas idênticas por divisão assimétrica – "self-renewal") e de se diferenciar em diversos tipos celulares (geração de uma célula-filha idêntica e outra célula mais diferenciada ou progenitora, a qual possui limitado potencial de auto-renovação, por divisão assimétrica – "cell fate") (Morrison; Kimble, 2006). A potência das células-tronco é definida pela sua habilidade de se dividir e produzir um ou mais tipos celulares diferentes. O zigoto é totipotente por contribuir para a formação de todos os tecidos embrionários e extra-embrionários. Dependendo do estágio de ontogênese no qual estas células são encontradas, elas podem ser classificadas em três principais categorias: embrionária, fetal e somática ou adulta.

No entanto, o conjunto de SCs obtidos a partir de condições *in vivo* e *in vitro* não é homogeneo, mas sim, as células estão em vários estágios de diferenciação. Portanto, a identificação de marcadores inequívocos é essencial para isolar estas células mais primitivas e para identificar claramente as diferentes fases de células indiferenciadas e comprometidas com a diferenciação.

As células-tronco embrionárias ("Embrionic Stem Cells, ESCs"), derivadas da massa interna do blastocisto são pluripotentes e podem se diferenciar em todos os tipos celulares dos três folhetos embrionários (mesoderma, ectoderma e endoderma) que formam o embrião como um todo (Evans; Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). A pluripotência das ESCs tem sido testada por dois diferentes meios: (I) a agregação e geração de corpos embrióides *in vitro*; e (II) a formação de teratoma (tumor benigno formado a partir de células dos três folhetos embrionários) a partir de células injetadas no subcutâneo de animais imunocomprometidos (Martin et al., 1975; Itskovitz-Eldor et al., 2000; O'Connor et al., 2008). Com estas técnicas, ficou comprovada a capacidade de multi-diferenciação das ESCs e que as células oriundas de teratomas também são capazes de formar corpos embrióides. Os genes e vias de sinalização que controlam a auto-renovação e o comprometimento celular

é uma assinatura molecular chamada de “stemness” (Ivanova et al., 2002). A cooperação entre os elementos intrínsecos (fatores de transcrição) e sinais extrínsecos (fatores de crescimento) vindos de seu microambiente regulam o comportamento destas células. Os três fatores de transcrição Nanog, Oct4 e Sox2 formam o cerne do circuito regulatório o qual mantém a capacidade de auto-renovação e pluripotência (Romeo et al., 2012). Além destes, outras moléculas são consideradas marcadores positivos mais comuns para a caracterização de ESCs, tais como SSEA-3 e SSEA-4 (“stage-specific embryonic antigen”), TRA-1-60 e TRA-1-81 (“tumor rejection antigens”) e fosfatase alcalina, sendo a SSEA-1 considerada um marcador negativo (Calloni et al., 2014). Apesar de seu grande potencial, a possibilidade de desenvolvimento de tumores benignos *in vivo* e os problemas éticos envolvidos com a manipulação e utilização destas células têm levado a desistência de utilização destas células em Terapia Celular e, apenas, como um modelo de estudo dos mecanismos envolvidos nas células-tronco.

As células-tronco fetais têm sido encontradas no fluído e membranas amnióticas, sangue do cordão umbilical e o cordão propriamente dito e placenta (Kmiecik et al., 2013). Estas células são do tipo mesenquimais e compartilham características semelhantes as das células-tronco mesenquimais adultas (descritas na próxima secção), mas também exibem algumas propriedades de ESCs. Os problemas éticos envolvidos nestas fontes de células são bastante reduzidos, pois são tecidos que normalmente são descartados após o nascimento.

As células-tronco derivadas de diferentes tecidos somáticos ou adultos (“Adult Stem Cells” - ASCs) são consideradas multipotentes, possuem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares, porém com certa limitação correspondente ao tecido de origem e são encontrados virtualmente em todos os tecidos adultos. Dentre elas, as células-tronco hematopoiéticas (“Hematopoietic Stem Cells” - HSCs) que foram descobertas na década de 1960 são as mais conhecidas, estudadas e são aplicadas com sucesso em Terapia Celular através do transplante de medula óssea. Estas células podem ser isoladas a partir da medula óssea (Sutherland et al., 1989), sangue do cordão umbilical (Nayar et al., 2002), fígado fetal (Craig et al., 1993) e sangue periférico (Jansen et al., 2005; McCredie et al., 1971). As células-tronco estromais ou células-tronco mesenquimais (“Mesenchymal Stem Cells” - MSCs) (Caplan, 1991a) são um tipo de ASC. Nos tecidos, estas células devem se concentram em microambientes definidos que mantenham suas “stemness”, sendo

esse conceito proposto inicialmente por Schofield (Schofield, 1978). Assim, o nicho da célula-tronco é definido como um local anatômico ou um microambiente onde ASCs residem e estão cercadas por MEC e outros componentes não celulares, tanto para proporcionar sinais que mantêm as células-tronco em repouso quanto para modular sua ativação (necessária para a manutenção, reparo e regeneração teciduais) (Jones et al., 2008a; Scadden, 2006). No caso de ativação, as células-tronco entram tanto em divisão simétrica ou assimétrica e moléculas solúveis tais como Wnt, Notch, FGF e proteínas Hedgehog são importantes reguladores parácrinos da função das células-tronco atuando tanto na proliferação quanto na diferenciação destas células (Mitsiadis et al., 2007; Mitsiadis; Papagerakis, 2011). Acredita-se que a membrana basal possa também participar em microambientes especializados e pode influenciar na função de uma população de células-tronco. Além disso, componentes não protéicos do microambiente local, tais como íons inorgânicos e produtos metabólicos podem afetar a função das células-tronco.

Mais recentemente, o dogma da Biologia do Desenvolvimento de que a diferenciação de células somáticas de mamíferos é um processo irreversível foi quebrado pelo grupo de pesquisa liderado pelo japonês Shinya Yamanaka, ganhador do prêmio Nobel de Medicina em 2012 (Takahashi; Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Células somáticas transfectadas com quatro fatores de transcrição (Nanog, Sox2, c-Myc e Klf4) são capazes de reverter seu estado diferenciado em indiferenciado e resgatar as características das ESCs, sendo, então chamadas de células-tronco pluripotente induzíveis ("induced Pluripotent Stem Cells" - iPSCs). Estas células têm sido muito estudadas como uma poderosa ferramenta para terapia celular, já que não apresenta os mesmo problemas éticos que envolvem as ESCs e, em tese, a reprogramação celular pode ser realizada em qualquer célula somática do indivíduo.

A descoberta de SCs trouxe novas possibilidades para a área científica e clínica e têm o potencial de serem aplicadas na terapia celular, terapia gênica, engenharia de tecidos, na descoberta de drogas, modelagem de doenças e biologia do desenvolvimento.

2.1.1 Células-Tronco Mesenquimais

No início dos anos 60, A. J. Friedenstein iniciou estudos pioneiros focados na interação entre o osso e o tecido hematopoiético. Uma rara população de células da medula óssea não hematopoéticas foi isolada e com as características de aderência ao plástico (aproximadamente 1 em 10.000 células nucleadas da medula óssea), suplementas com soro fetal, com capacidade de formar colônias com aparência heterogênea a partir de uma única célula, após alguns dias em cultura, iniciaram proliferação e diferenciação celular em células diferenciadas da linhagem mesenquimal (osteoblasto) (Friedenstein et al., 1970). Por mais de 40 anos, estas células foram chamadas de unidades formadoras de colônia fibroblástica ("Colony-Forming Unit-Fibroblast Cells" – CFU-Fs) ou de células estromais da medula óssea e, mais tarde, de células-tronco da medula óssea ("Bone Marrow Stem Cells" – BMSCs). A atual categorização destas células em MSCs foi proposta por Arnold Caplan (Caplan, 1991) devido a sua capacidade de se diferenciarem em tecidos derivados do mesoderma (osso, cartilage e tecido adiposo) ou células estromais porque pertencem ao estroma e acredita-se que estas céulas tem um papel de suporte físico para o nicho das HSCs. Se estas células podem ser absolutamente consideradas as verdadeiras células-tronco ou como progenitoras multipotentes de linhagens mesenquimais, tem sido o foco de intense debate. Por conseguinte, foi proposto o termo células estromais mesenquimais multipotentes ("Multipotent Mesenchymal Stromal Cells") que foi adotado no lugar de MSCs (Bianco et al., 2008; Horwitz et al., 2005). Assim, muita confusão em relação a nomenclatura a ser adotada fez com que, em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular ("International Society for Cellular Therapy" – ISCT) publicasse os chamados "critérios mínimos" para identificar uma célula-tronco humana como uma MSC. Dentre estes estão a adesão celular ao plástico de células com morfologia fibroblastóide, expressão de proteínas da superfície celular CD73, CD90, CD105 e, em conjunto, com a ausência de expressão de CD45, CD34, CD14, CD11b ou CD79a ou CD19 e HLA-DR e diferenciarem, ao menos, em osso, cartilagem e tecido adiposo (Dominici et al., 2006). As MSCs são células multipotentes que se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Pittenger et al., 1999),

mas também em linhagens ectodermais (Dezawa, 2008; Sasaki et al., 2008) e endodermais (Sato et al., 2005).

As MSCs já foram isoladas de diversas regiões do corpo humano, tais como tecido adiposo (Zuk et al., 2001), músculo (Williams et al., 1999), fígado (Campagnoli et al., 2001), pulmão (Fan et al., 2005), sangue de cordão umbilical (Erices et al., 2000), cordão umbilical ou geleia de Wharton (Sarugaser et al., 2005), fluido e membrana aminiótica (In 't Anker et al., 2003), coração (Beltrami et al., 2003), osso trabecular (Noth et al., 2002), vasos sanguíneos (Pasquinelli et al., 2010), sangue periférico (Zvaifler et al., 2000), derme (Riekstina et al., 2009), dente (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003), fluido e membrana sinovial (De et al., 2001; De et al., 2003), periósteo (De et al., 2001; De et al., 2006; Nakahara et al., 1991), cartilage articular (Dowthwaite et al., 2004), sangue menstrual (Hida et al., 2008), útero (Gargett et al., 2008), trompa de falópio (Jazedje et al., 2009) e tecidos fetais (Campagnoli et al., 2001; Miao et al., 2006).

Embora as MSCs derivadas dos mais diversos tecidos e órgãos compartilhem propriedades biológicas básicas, mas disparidades substanciais existem entre elas, incluindo: (I) diferenças no potencial de expansão sob condições idênticas de cultivo celular (Kern et al., 2006); (II) potencial de diferenciação nas linhagens mesenquimais clássicas; e (III) expressão dos marcadores de superfície celular (Baksh et al., 2007).

Pouco se conhece sobre as moléculas que compõem o nicho das MSCs *in vivo* (da Silva et al., 2006). Torna-se mais evidente que existam nichos tecido-específicos, já que as MSCs apresentam fenótipos e funções bem distintas (Hennig et al., 2007; Huang et al., 2009; Ivanova et al., 2002; Meijer et al., 2008; Roubelakis et al., 2007; Zhu et al., 2008). Uma das maiores questões não resolvidas sobre as MSCs está relacionada a sua identificação dentro de seu nicho *in vivo*. A precisa localização tecidual das MSCs é dificultada pela ausência de um marcador universal que identifique as MSCs (Bianco, et al. 2008; McGonagle; Jones, 2008; Morikawa et al., 2009), entretanto, alguns autores sugerem que aparentemente as MSCs são residentes em nichos perivasculares ao longo dos tecidos e órgãos do organismo (Kuhn; Tuan, 2010), embora isto não seja válido para MSCs derivadas de tecidos avasculares como a cartilagem articular (Barbero et al., 2003; Dell'Accio et al., 2003; Dowthwaite et al., 2004). Existem evidências crescentes de que os pericitos (ou células murais ou células de Rouget) possam ser as células nativas *in vivo* das

MSCs *in vitro*. Estas células são descritas como ramificações celulares localizadas no lado abluminal (voltada para o meio extravascular) de pequenos vasos sanguíneos (arteríolas, capilares e vênulas) e estão em íntima conexão com as células endoteliais dos vasos. As funções dos pericitos incluem a estabilização dos vasos, síntese de proteínas da MEC, propriedades tipo macrófago, atividade na defesa imunológica e, possivelmente, potencial mesenquimal (Diaz-Flores et al., 2009). A sua proximidade aos vasos permitiria aos pericitos rapidamente entrarem na corrente sanguínea para substituir as células perdidas devido ao *turnover* fisiológico ou reparo de lesões locais (da Silva et al., 2008). Brighton et al.(1992) demonstraram que os pericitos exibem *in vitro* um fenótipo similar aos das BMSCs, outros autores mostrarem que estes podem estar envolvidos na geração de cartilagem e osso (Diaz-Flores et al., 1991; Diaz-Flores et al., 1992). Além disso, os pericitos de vários tecidos adultos e fetais expressam marcadores de superfície celular de MSCs, tais como CD44, CD73, CD90 e CD105. Pericitos frescos isolados da placenta quando injetados em ratos imunodeficientes são miogênicos (Crisan et al., 2008). As MSCs e pericitos compartilham o marcador de superficie celular CD146 e o receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta ("Platelet-Derived Growth Factor Receptor – PDGFR) (Crisan et al., 2008). No entanto, apesar da crescente evidência circunstancial de que os pericitos podem ser as células nativas *in vivo* dss MSCs *in vitro*, não há nenhuma evidência direta até agora de que os pericitos tenham as características principais de células-tronco, incluindo a proliferação e diferenciação em células com fenótipos de células maduras *in vivo* seguido de lesão, por experimentos de rastreamento de linhagem celular, uma exigência que deve aplicar-se também a outras populações de MSCs. Em estudos recentes de fato concluíram que pericitos pode não ser a única fonte de MSCs (Crisan et al., 2008). Assim, a questão permanece em aberto se as MSCs são um único tipo de célula, distintas do pericito, com a função específica de substituir células mesenquimais adultas perdidas no turnover fisiológico, lesão ou doença, ou se existem vários sub-populações de MSCs ou células progenitoras, que podem ser funcionalmente distintas. Experimentos de rastreamento de linhagem celular, agora cada vez mais viáveis com as modernas tecnologias e sistemas de detecção, vai lançar luz sobre estas questões não resolvidas relacionadas com a natureza *in vivo* das MSCs nativas no seu nicho natural tecidual (Augello et al., 2010).

Existe a possibilidade de que o fenótipo e as funções das MSCs podem variar *in vivo* e *in vitro* devido a sua remoção do seu ambiente natural e o uso de condições de crescimento químicas e físicas que podem alterar as suas características. As MSCs são conhecidas por sofrer rearranjos fenotípicos durante a manipulação *ex vivo*, perdendo a expressão de alguns marcadores ao mesmo tempo que adquiri outros novos (Jones et al., 2002). Quando as MSCs são isoladas dos diferentes tecidos e órgãos, uma população heterogênea de células com diferentes potenciais de diferenciação podem ser obtidas. Além disso, estas células não são muito abundantes, por exemplo, na medula óssea, as MSCs compreendem 0,01 a 0,001% da população total de células (Bianco et al., 2001). Assim, a definição de marcadores que tornam possível isolar as MSCs mais primitivas e para identificar as sub-populações com potenciais diferentes para gerar células maduras é necessário para melhorar a caracterização molecular e celular das MSCs. Além dos marcadores definidos pela ISCT, muitos outros marcadores foram identificados e utilizados pelos pesquisadores, sendo os marcadores positivos mais comuns o CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 e HLA-ABC e os marcadores negativos mais comuns o CD14, CD31, CD34, CD45, CD62E, CD62L, CD62P e HLA-DR. Dentre eles, quarto marcadores estão incontestavelmente presentes nas MSCs: CD73, CD105, CD44 e CD90 (Haynesworth et al., 1992; Jones et al., 2002). Porém, as populações $CD73^{+}/CD105^{+}/CD44^{+}/CD90^{+}$ são também identificadas em células estromais e em fibroblastos e servem apenas para descriminar as MSCs de células de origem hematopoiética (Ishii et al., 2005; Jones et al., 2008b; Jones et al., 2002; Jones et al., 2004; Wagner et al., 2005). No entanto, devido a grande diversidade de fontes de obtenção das MSCs, alguns marcadores positivos parecem ser tecido-específicos. Ainda, alguns trabalhos têm mostrado que marcadores associados a ESCs foram identificados em MSCs. O nível de expressão de alguns destes marcadores são regulados negativamente quando as MSCs são induzidas a diferenciação seguido do aumento de SSEA-1. Esta alteração na expressão dos marcadores de MSCs recapitula o que é observado durante a diferenciação de ESCs (Calloni et al., 2013).

Além das características de multi-diferenciação, as MSCs exercem efeitos tróficos por secretarem várias moléculas bioativas que apresentam propriedades anti-apoptóticas, imunorregutórias, angiogênicas, quimioatrativas e anti-cicatrizantes, provendo uma base para seu uso como ferramenta para criar microambientes

regenerativos locais *in vivo*. Outra surpreendente característica das MSCs é sua baixa imunogenicidade e parecem ser imunossupressoras *in vitro*. Esta importante propriedade imunorregulatória as tornam promissoras para o uso terapêutico em uma variedade de doenças autoimunes, relacionadas a inflamação, no transplante de órgãos sólidos e no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (Si et al., 2011). As MSCs podem atuar por dois principais mecanismos: (I) pela secreção de uma gama de fatores solúveis, tais como prostaglandina E_2 (PGE_2), indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO), fator de cescimento transformate beta (TGB-β) e o antígeno leucocitário humano G5 (HLA-G5); e (II) pelas interações entre as MSCs e células imunes, tais como células T, B, macrófagos e células dendríticas (Li et al., 2014).

Quando inoculadas *in vivo,* as MSCs podem se diferenciar, ao menos, em três tipos de células: (I) células-tecido específico, as quais são requeridas pelos tecidos com injúria ou lesão, por exemplo, MSCs inoculadas no coração podem se diferenciar em cardiomiócitos, células de músculo liso ou células endoteliais vasculares, as quais são importantes componentes do tecido cardíaco (Barbash et al., 2003; Gojo; Umezawa, 2003; Psaltis et al., 2008); (II) células relacionadas a função, as quais são desejadas pelo tecido local, podendo se diferenciar em células que possivelmente participem da composição de uma microambiente especial ou nicho para o reparo tecidual (Petrie Aronin; Tuan, 2010); (III) células regulatórias, as quais contribuem para o reparo tecidual e regeneração através da secreção de citocinas que podem possuir funções tróficas e imunomodulatórias (Ankrum; Karp, 2010). Os mecanismos moleculares e ambientais que controlam a diferenciação das MSCs não são completamente compreendidos e não foi ainda identificado um marcador fenotípico específico associado com a predição do potencial de diferenciação destas células.

A associação das propriedades de potencial de multi-diferenciação, seus efeitos tróficos e associado ao seu perfil imunoprevilegiado têm despertado grande interesse na utilização das MSCs em estratégias baseadas em terapia celular tanto autóloga quanto alogênica.

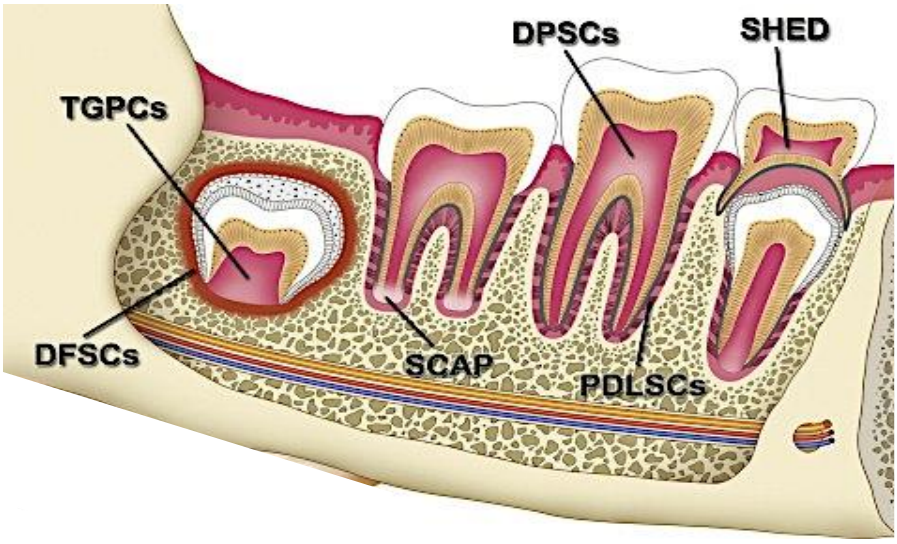
2.1.1.1 Células-Tronco Dentais

O dente é o resultado de interações finamente orquestradas entre as células do epitélio oral ectodermal, que formam o órgão do esmalte (para a formação do esmalte), e células mesenquimais derivadas da crista neural (tecido embrionário transiente que origina as células-tronco da crista neural/"Neural Crest Stem Cells" - NCSCs) que constituem uma população de células-tronco pluripotentes e migratórias que apresentam potencial de desenvolvimento similares as ESCs. Estas células são capazes de se diferenciarem em células da glia, neurônios, ossos, tendões, melanócitos, condrócitos, células endócrinas, células adiposas, a papila e o folículo dentais, dentre outros. Apesar da pluripotência das NCSCs ser restrita ao desenvolvimento embrionário, seus homólogos pós-natais mantêm a capacidade de auto-renovação e "stemness" (Le Douarin; Dupin, 2003; Le Douarin et al., 2004; Le Douarin et al., 2008). Estas MSCs originam os outros components do dente: dentina, polpa, cemento e ligamento periodontal (Peters; Balling, 1999; Thesleff; Aberg, 1999).

No início do anos 2000, as células-tronco dentais ("Dental Stem Cells" – DSCs) foram isoladas e caracterizadas em humanos e, até o momento, seis populações de MSCs distintas foram categorizadas: (I) durante o desenvolvimento dentário, no folículo dentário ("Dental Follicle Progenitor Cells" - DFPCs) (Morsczeck et al., 2004) e na papila apical ("Stem Cells from Apical Papilla" – SCAPs ou "Apical Papilla Stem Cells" - APSCs) (Sonoyama et al., 2006); (II) no indivíduo adulto, no ligamento periodontal ("Periodontal Ligament Stem Cells" - PDLSCs) (Seo et al., 2004), na gengiva ("Gingiva-derived MSCs" - GMSCs) (Zhang et al., 2009), na polpa dentária de dentes decíduos ("Stem Cells Exfoliated Deciduos Teeth" - SHEDs) (Miura et al., 2003), de dentes permanentes ("Dental Pulp Stem Cells" - DPSCs) (Gronthos et al., 2000) (Figura 2.1). Ainda, células-tronco da polpa dentária de dentes supranumerários também já foram isoladas e caracterizadas (Huang et al., 2008). Populações pluripotentes que expressão marcadores de ESCs, com proliferação indefinida e que formam teratoma *in vivo* já foram isoladas a partir de polpas dentárias de dentes decíduos ("Immature Dental Pulp Stem Cells" - IDPSCs) (Kerkis et al., 2006) e de terceiros molares de indivíduos adultos (Atari et al., 2012). Populações tipo pluripotentes, semelhantes as iPSCs obtidas de fibroblastos, foram

com sucesso obtidas a partir de DPSCs (Oda et al., 2010; Yan et al., 2010), SHEDs (Yan et al., 2010) e SCAP (Yan et al., 2010), por reprogramação celular ("Dental Pulp Pluripotent like Stem Cells" – DPPSCs).

Embora as MSCs derivadas das diferentes DSCs formem populações distintas, estas compartilham características comuns de capacidade de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em, ao menos, três linhagens celulares diferentes (Huang et al., 2009). As DSCs expressarem STRO-1 (Huang et al. 2009), proteinas associadas ao endotélio (CD106, CD146), tecidos perivasculares (α-actina de músculo liso, CD146 e antigen de pericito 3G5), osso, dentina e cemento (BMP, fosfatase alcalina, osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea) e de fibroblastos (colagenos tipo I e III) (Gronthos et al., 2000; Shi; Gronthos 2003). A regeneração/revascularização de tecidos pulpares utilizando DSCs necessita de fatores de crescimento, carreadores (biomateriais) e suprimento vascular (Hargreaves et al., 2008; Huang et al., 2010; Srisuwan et al., 2013).



Fonte: Egusa et al. (2012)

Figura 2.1 – Representação esquemática das fontes de células-tronco dentais (Fonte: Egusa et al., (2012).

2.1.1.1.1 Células-tronco mesenquimais da polpa dentária adulta (DPSCs)

As DPSCs foram inicialmente isoladas de polpas dentárias extraídas de terceiros molares de indivíduos adultos foram caracterizadas como clonogênicas e

altamente proliferativas, com frequência de formação de colônia alta e produção de nódulos de calcificação densos e reconhecidas como uma população de MSCs devido a presença de marcadores de membrana celular encontrados em BMSCs: STRO-1 e CD146. Além disso, estas células STRO-1 e CD146-positivas foram localizadas ao redor dos vasos sanguíneos e regiões perineurais da polpa dentária remanescente (Shi et al., 2003).

Alguns marcadores específicos de células-tronco não são expressos uniformemente em todas as culturas de DPSCs, sendo uma população bastante heterogênea e muito difícil de ser realmente isolada como uma população homogênea, pois não há nenhum marcador exclusivo (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2006b). Apesar do CD34 ser considerado um marcador de HSC é também marcador de progenitores endoteliais e é considerado um marcador positivo em DPSCs (Laino et al., 2005).

Estudos recentes demonstraram que DPSCs humanas podem se diferenciar em linhagens mesenquimais e não mesenquimais, tais como células neurogênicas (Gronthos et al., 2002), osteogênicas (Dissanayaka et al., 2012; Laino et al., 2005), odontoblastos (Gronthos et al., 2002), miogênicas (Gronthos et al., 2000), condrogênicas (Zhang et al., 2006), adipogênicas (Gronthos et al., 2002) e endoteliais (Dissanayaka et al., 2012) induzidas *in vitro* com meios de diferenciação específicos. Uma sub-população de DPSCs foi isolada e chamada de “células-tronco da polpa dentária produtora de osso estromal” (“Stromal Bone-producing Dental Pulp Stem Cells” – SBP-DPSCs) (CD117 ou c-kit^{+}/CD34^{+}/STRO-1^{+}) que tem o potencial de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos, mioblastos, endoteliócitos, melanócitos e progenitores de células neurais (neurônios e células da glia), sendo de origem da crista neural (Graziano et al., 2008; Laino et al., 2006; Papaccio; Laino, 2006). Uma linhagem imortalizada foi gerada a partir de DPSC e tem a habilidade de se diferenciar em odontoblastos e secretar matriz de dentina (Kitagawa et al., 2007).

As DPSCs semeadas em um carreador de hidroxiapatita/fosfato tricálcio (HA/TCP) e implantadas em camundongos imunodeficientes demonstraram o potencial de regenerar o complexo dentino-pulpar e formar um tecido fibroso contendo vasos sanguíneos em um arranjo similar ao dente humano normal (Batouli et al., 2003; Gronthos et al., 2000; Peng et al., 2009; Shi et al., 2005). As DPSCs semeadas sobre discos de dentina se diferenciam em células tipo odontoblasto com corpo celular polarizado e processos celulares estendidos para dentro dos túbulos

dentinários existentes (Huang et al., 2006a; Huang et al., 2006b). Em diversos modelos animais com utilizaração das DPSCs têm mostrado diferenciação tecido-específica destas células *in vivo*, tais como infarto agudo do miocárdio com diferenciação em cardiomiócitos (Gandia et al., 2008), reconstrução de defeitos cranio-faciais com diferenciação em osteoblastos (de Mendonca et al., 2008), distrofia muscular com diferenciação em células musculares esqueléticas (Kerkis et al., 2008).

Comparativamente com as BMSCs, as DPSCs tem uma maior capacidade de formar CFUs, alta taxa replicativa (80-100 vezes mais) e sem sinais de senescência (Gronthos et al., 2000). O potencial de diferenciação das DPSCs parece ser diferente do apresentado pelas BMSCs, pois há uma maior tendência de se diferenciarem em linhagens osteo/odontogênicas (Huang et al.,2009). O perfil de expressão entre as BMSCs e as DPSCs verificado por microarranjos de DNA mostrou que ambas as populações compartilham mais de 4.000 genes humanos e alguns genes foram diferencialmente encontrados (Shi et al., 2001). Vale ressaltar que a expressão da sialofosfoproteína da dentina, ou seja, uma proteína precursora específica dos odontoblastos, não está presente nas culturas de DPSCs ou SHEDs. Este fato pode comprovar que essas células representam um fenótipo pré-odontogênico indiferenciado (Gronthos et al., 2000; Shi et al., 2005). Por outro lado, as DPSCs expressão marcadores ósseos, como sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina e colágenos do tipo I e III, de um modo semelhante ao BMSCs (Goldberg; Smith, 2004; Gronthos et al., 2000; Krebsbach; Robey, 2002; Shi et al., 2005). As DPSCs e BMSCs compartilham os marcadores de superfície celular CD44, CD106, CD146, 3G5 e STRO-1(Shi et al., 2005).

A utilização clínica das DPSCs é atribuída ao seu isolamento simples e conveniente, a falta de controvérsia ética, e baixa imunogenicidade, assim, permitindo o uso alógeno sem a administração de agentes imunossupressores (Huang et al., 2009; Pierdomenico et al., 2005). Portanto, a coleta de DPSCs é um método não invasivo, que pode ser realizada em crianças e adultos (principalmente por recomendação de extração cirúrgica dos dentes), além de apresentar a vantagem de poder ser criopreservada e armazenada por longos períodos, sendo plausível a criação de um banco de DPSCs (Arora et al., 2009; Tirino et al., 2011).

2.2 – MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A idéia de que a matriz extracelular (MEC) é um arcabouço de preenchimento intercelular é algo que evoluiu para um conceito onde se mostra como uma interface de controle ativo das funções celulares e teciduais. É composta por uma rede de diferentes substâncias, como diferentes tipos de colágeno, proteínas microfibrilares, polissacarídeos, proteoglicanos, citocinas, fatores de crescimento e glicoproteínas. Essa composição é que propicia à MEC um papel desse controle celular-tecidual. A MEC funciona ainda como um reservatório de fatores de crescimento que podem ser rapidamente utilizados durante a sua degradação e remodelação, promovendo desse modo um ambiente favorável ao crescimento, proliferação, migração, morfologia e diferenciação celular, fundamentais para a permanente remodelação tecidual necessária durante o desenvolvimento e crescimento (Hubmacher; Apte, 2013).

A MEC interage com as células via receptores tais como integrinas (Fata et al., 2004), sindecanas (Saunders et al., 1989), tenascina (Lightner; Erickson, 1990), β-1,4-galactosiltransferase (GalTase) (Hathaway; Shur, 1996), distroglicana (Durbeej; Ekblom, 1997; Muschler et al., 2002), domínio receptor de discoidina 1 (*discoidin domain receptor 1* – DDR1) (Vogel et al., 2001) e receptores tipo Toll (Schaefer et al., 2005), que são importantes para regular a vias de transdução de sinais intracelulares imprescindíveis para a polarização, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular (Rohrbach et al., 1993).

As células utilizam várias estratégias para regular as proteinases da MEC: regulação da transcrição, controle do tráfego de vesículas ou de estruturas ligadas à membrana celular (secreção e endocitose), ativação de pró-enzimas e a produção de inibidores endógenos.

É bastante sabido que proteinas secretadas desempenham funções chave e coordenam muitas funções biológicas, tais como crescimento, divisão, diferenciação, apoptose e sinalização celulares. O secretoma é referido como um conjunto rico e complexo de moléculas secretadas a partir de células vivas ou da superfície celular. Acredita-se que estas moléculas sejam codificadas por cerca de 10% do genoma humano. Nos últimos anos, muitos esforços têm se concentrado na detecção e

caracterização destas moléculas em células-tronco, porém pouco se conhece (Makridakis et al., 2013).

2.2.1 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As metaloproteinases de matriz (MMPs), as serralisinas (enzimas de bactérias), as astacinas e as adamalisinas (ADAMs - desintegrina e metaloproteinase - e as ADAM-TS - ADAMs com repetições de trombospondina) são membros das metaloproteinases de mamíferos (MPs) dentro da superfamília metzincina. Estas enzimas possuem múltiplos domínios, são endopeptidases zinco-dependentes, com um perfil estrutural comum e todas apresentam a mesma configuração terciária do sítio catalítico (estrutura secundária caracterizada pela presença de uma seqüência altamente conservada contendo 3 histidinas ligadas ao zinco - no sítio catalítico - e uma metionina), chamada de metzincina (Stocker et al., 1995). As MPs apresentam uma seqüência peptídica ligada ao zinco característica (HEBXHXBGBXH**Z**), onde o aminoácido variável “Z” é específico de cada família (Stocker et al., 1995). Embora elas tenham uma alta similaridade estrutural, as funções desempenhadas pelas MPs são enormemente variadas (Brinckerhoff; Matrisian, 2002).

As MMPs são uma importante família e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção dos componentes da MEC. Elas processam e degradam inúmeras proteínas peri e extracelulares e, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (Birkedal-Hansen, 1993), além de serem as únicas enzimas capazes de clivar colágenos fibrilares (Curran; Murray, 1999).

A primeira MMP descrita foi encontrada em caudas de girinos em metamorfose e esta foi denominada de colagenase por Gross e Lapière (1962). As MMPs de mamíferos são classificadas em solúveis e MMPs ancoradas à membrana celular (MT-MMP), de acordo com suas especificidades enzima-substrato *in vitro*. A maioria das MMPs solúveis é secretada como pró-enzimas e requerem ativação no meio extracelular (Harper et al., 1971), enquanto que as MT-MMPs são ativadas

intracelularmente e expressas na superfície celular na forma ativa (Nabeshima et al., 2002). As MMPs solúveis são classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e outras. Já as MT-MMPs são compostas por seis membros diferentes. A subclassificação das MMPs foi, originalmente, baseada em seus correspondentes substratos da MEC, mas, atualmente, as MMPs são designadas numericamente de acordo com a ordem cronológica na qual foram identificadas e agrupadas de acordo com sua estrutura tridimensional (Egeblad; Werb, 2002; Nabeshima et al., 2002) (Quadro 2.1). As MMPs -4, -5, -6 e -22 foram removidas da lista por serem idênticas a outros membros (Nabeshima et al., 2002; Nagase et al., 2006). As MMPs são proteinases extracelulares, mas, estudos têm mostrado que as MMPs -1 (Limb et al., 2005; Nabeshima et al., 2002), -2 (Kwan et al., 2004; Nabeshima et al., 2002) e -11 (Luo et al., 2002; Nabeshima et al., 2002) são também encontradas intracelularmente e podem interagir com proteínas intracelulares.

Grupo	***MMP***	***Nome***	***Formas latente e Ativa (kDa)***	***Substratos***
Colagenases	1	Colagenase Intersticial, Colagenase Fibroblástica, Colagenase Tecidual ou Colagenase-1	55/45	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, agrecana, versicana, perlecana, fibronectina, ligante de proteína, caseína, α2-M, ovostatina, nidogênio, pró-TNF-α, L-selectina, α1-PI, PZP, IGFBP-3, pró-IL-1β e IL-1β, MCP-3, SDF-1
	8	Colagenase Neutrofílica, Colagenase de Neutrófilo	75/58	Col I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina, agrecana, α1-PI, antiplasmina-α2, fibronectina, receptor de protease ativada 1
	13	Polimorfonuclear, Colagenase Granulocítica ou Colagenase-2 Colagenase-3	60/48	Col I, II, III e IV, XVIII, gelatina, PAI-2, agrecana, perlecana, laminina, elastina, tenascina, fibrilina, fibronectina, osteonectina, MCP-3, SDF-1
Gelatinases	2	Gelatinase A, Gelatinase Neutrofílica ou Colagenases tipo IV de 72 kDa	72/66	Colágenos: I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, XVIII, Gelatina tipo I, Decorina, Elastina, Entactina/Nidogênio, Fibrilina, Fibrina, Fibrinogênio, Fibronectina, Fibulina, Laminina-5 (γ2), Plasminogênio, Tenascina, Vitronectina, Agrecana, Versicana, Mielina Básica, Osteonectina, Amelogenina, Condroitina sulfato, IGFBP-3, Pró-IL-1β, IL-1β, IL-8, Pró-TGF-β, Pró-TNF-α, ligante de Proteína, Substância P, C1q, α1-AC, α1-PI, receptor 1 de FGF, MCP-3, SDF-1, adrenomodulina, endotelina grande, LTBP1, Galactina-3.
	9	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV de 92 kDa	92/86	Colágenos: II, IV, V, VII, X, XI, XIV e XVIII, Gelatina tipo I, Caseína, Decorina, Elastina, Fibrilina, Fibrina, Fibrinogênio, Plasminogênio, Vitronectina, Agrecana, Versicana, Entactina/Nidogênio, ICAM-1, Galactina-3 , Mielina básica, Osteonectina, Pró-IL-1β, IL-1β, IL-2Rα, Pró-TGF-β, Pró-TNF-α, ligante de Proteína, Proteína P, C1q, α1-PI,α2-M, MCP-2, SDF-1, LTBP1.
Estromelisina s	3	Estromelisina-1, Transina-1, Proteoglicanase ou Proteína Ativadora de Pró-colagenase	57/45	Col III, IV, IX, X, XVIII, gelatina, agrecana, versicana, decorina, perlecana, fibrilina, nidogênio, fibronectina, laminina, elastina, plasminogênio, caseína, fibrinogênio, antitrombina-III, α2-M, ovostatina, α1-PI, pró-TNF, IGFBP-3, E-caderina, osteonectina, pró-IL-1β, MCP-3, SDF-1
	10	Estromelisina-2 ou Transina-2	57/44	Col III, IV, V, gelatina, caseína, agrecana, elastina, proteína link, fibronectina
	11	Estromelisina-3	51/44	Laminina, fibronectina, gelatina, α1-PI, IGF, IGFBP-1
MMPs Tipo de Membrana	14	MT1-MMP	66/56	Col I, II, III, XVIII, agrecana, gel I, caseína, nidogênio, elastina, fibronectina, Fator XII, perlecanaa, fibrina, fibrilina, fibrinogênio, vitronectina, laminina-1, laminina-5 (γ2), laminina-5(β3), pró-TGF-β, pró-TNF-α, sindecana-1, proteína inibidora de mielina(Belien et al., 1999a), CD44(Kajita et al., 2001a), MCP-3, tTG, MUC1, lumicana, sulfato de dermatana, tenascina C, LDL-RP, integrina αv, IL-8, SDF-1, KiSS-1 proteína, metastina, CTGF, DR6, gC1qr, glicana β, α1-PI, α2M, tTG, apoA-I, apoE, gelsolina plasmática, apoC-II, IL-8, SLPI, pro-TNF-a, CTGF, APP
	15	MT2-MMP	72/60	Col I, IV, gel, agrecanaa, fibronectina, fibrilina, tenascina C, laminina-1, nidogênio, tTG, perlecanaa, LDL-RP, fibronectina
	16	MT3-MMP	64/52	Col II, III, gel, caseína, vitronectina, fibronectina, tTG, agrecanaa, CD44, α1-PI, sindecana, LDL-RP, laminina-1, glicana β, KiSS-1 proteína, metastina, α2-M, APP
	17	MT4-MMP	57/53	Fibrina, gel, fibrinogênio, pró-TNF-α, agrecanaase-1 (ADAMTS-4), LDL-RP
	24	MT5-MMP	-	KiSS-1 proteína, etastina, gel, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, APP
	25	MT6-MMP ou Leucosina	-	Fibrina, fibrinogênio, col IV, gel, fibronectina, sulfato de dermatana e condroitina, N-caderina
Matrilisina	7	Matrilisina, Matrina, Metaloproteinase Uterina ou PUMP-1	28/19	Col IV, X, XVIII, gelatina, agrecana, proteína link, elastina, fibronectina, decorina, laminina, plasminogênio, entactina, caseína, transferrina, mielina básica, α1-PI, pró-TNF-α, FASL, criptina, osteonectina, IGFBP-3, E-caderina, RANKL, EGF ligado a heparina
	26	Endometase ou Matrilisina-2	-	Col IV, fibronectina, vitronectina
Outras	12	Metaloelastase Macrofágica, Elastase Macrofágica ou Metaloelastase Colagenase-4 (*Xenopus*)	54/45-22	Col IV, XVIII, gelatina, elastina, α1-PI, fibronectina, agrecana, entactina/nidogênio, plasminogênio, vitronectina, fibrilina, laminina, pró-TNF, mielina básica, receptor ativador de plasminogênio tipo urokinase
	18	RASI-1	-	Col IV, gelatina, tenascina, agrecana, IGFBP-3, laminina-5 (γ2), nidogênio-1, COMP
	19	Enamelisina	54/22	Amelogenina, Col XVIII, agrecana, COMP
	20	Homóloga ao *Xenopus* XMMP	-	-
	21	CMMP (*chicken*) ou MMP associada à Artrite Reumatóide	54/46-41	Agrecana
	23	Cisteína Array MMP (CA-MMP), Femalisina, MIFR ou MMP-21/MMP-22¥	55/?	-
	27	Epilisina		-
Sem Grupo	-	Mcol-A (*mouse*)	-	-
	-	Mcol-B (*mouse*)	-	-
	-	Gelatinase de 75-kDa (*Chicken*)	-	-

α2-M: α2-macroblogulina, α1-PI: inibidor de proteinase α1 (*α1-proteinase inhibitor*), COMP: Proteína de matriz oligomérica da cartilage (*cartilage oligomeric matrix protein*), FASL: ligante de Fas, IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*; LDL-RP: receptor relacionado a lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor protein*), MCP-3: proteína quimiotática de monócitos-3 (*monocyte chemoattractant protein-3*), PZP, MUC: mucina transmembrana, PAI-2: inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*plasminogen activator inhibitor-2*), : proteína da zona de pregnância (*pregnancy zone protein*), RANKL: ligante de RANK, SDF: Fator derivado de célula estromal 1 *(stromal cell-derived factor-1)*. Dados extraídos de: (Fessler et al., 1984; Fosang et al., 1992; Murphy et al., 1993; Fowlkes et al., 1994; Gearing et al., 1994; Ochieng et al., 1994; Aimes et al., 1995; Levi et al., 1996; d'Ortho et al., 1997; Giannelli et al., 1997; Imai et al., 1997; Mecham et al., 1997; Ohuchi et al., 1997; Buttner et al., 1998; Hiraoka et al., 1998; Ashworth et al., 1999; Bartlett et al., 1999; Belien et al., 1999b; Ellerbroek et al., 1999; Fernandez-Patron et al., 1999; Berton et al., 2000; English et al., 2000; Ferreras et al., 2000; Hahn-Dantona et al., 2000; Haro et al., 2000; Hiller et al., 2000; Koshikawa et al., 2000; McQuibban et al., 2000; Belkin et al., 2001; English et al., 2001; Kajita et al., 2001b; Lin et al., 2001; Dallas et al., 2002; Deryugina et al., 2002; Egeblad; Werb, 2002; Fukui et al., 2002; Karsdal et al., 2002; Krekoski et al., 2002; Endo et al., 2003; Gao et al., 2004; Hao et al., 2004; Hwang et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Overall, 2004; Boire et al., 2005; Ahmad et al., 2006; Itoh et al., 2006; Kim et al., 2006; Lemaitre et al., 2006; Monea et al., 2006).

Quadro 2.1 Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos

35

As MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas e a maioria são secretadas na forma latente, ou seja, pró-enzimas (zimogênio), contendo 5 domínios básicos: (I) N-terminal pré-peptídico (cerca de 10 kDa), sinalizador da secreção e removido no retículo endoplasmático rugoso; (II) N-terminal pró-peptídico, removido intra ou extracelularmente; (III) catalítico (20 kDa); (IV) região da alça; e (V) C-terminal tipo hemopexina (30 kDa) (Nabeshima et al., 2002; Visse; Nagase, 2003) (Figura 2.2). Estes domínios representam a composição básica de todas as MMPs (exceto das MMPs -7 e -23, as mais simples dentre as MMPs e não possuem o domínio hemopexina e nem a região da alça), e o aumento dos domínios está diretamente relacionado com o aumento da especificidade enzima-substrato ou em relação a sua localização celular, como é o caso das MT-MMPs. Todas MMPs são ativas em pH neutro, requerem Ca^{2+} para ativação e manutenção da conformação tridimensional. As MMPs solúveis são ativadas por clivagem enzimática (por serina proteinases e outras MMPs do domínio pró-peptídico (PRCGVPDV - especificamente entre a cisteína e o Zn^{+2}), liberando um fragmento de, aproximadamente, 10 kDa.
Este processo resulta na alteração conformacional da proteína, revelando assim o seu sítio ativo e este é o mecanismo de ativação conhecido como *cysteine switch* (Nabeshima et al., 2002; Springman et al., 1990; Van Wart; Birkedal-Hanse, 1990). Existe ainda outro mecanismo de ativação chamado *stepwise activation* (Nagase et al., 1990), onde a clivagem de um determinado ponto do domínio pró-peptídico remove apenas uma parte da seqüência peptídica e sua completa remoção é, freqüentemente, efetuada por uma MMP intermediária ou por outra ativa.

Embora a maior parte destas enzimas seja secretada como pró-enzimas, dez pró-MMPs possuem uma seqüência de reconhecimento da pró-proteína convertase tipo furina localizada no final do segmento pró-peptídeo e podem ser ativadas intracelularmente e secretadas para a MEC ou ancoradas a membrana celular na forma ativa (Pei; Weiss, 1995; Sato et al., 1996). Elas podem ainda ser ativadas por agentes não proteolíticos, tais como agentes reativos de SH, compostos de mercúrio, espécies reativas de oxigênio e desnaturantes, pelo mesmo mecanismo de clivagem entre a Cys-Zn^{+2} (Nagase, 1997).

MMPs presentes em células normais e localizadas pericelularmente, no tempo e quantidades corretas, são ativadas ou inibidas apropriadamente. Então, estas enzimas são fortemente reguladas aos níveis transcricional, pós-transcricional,

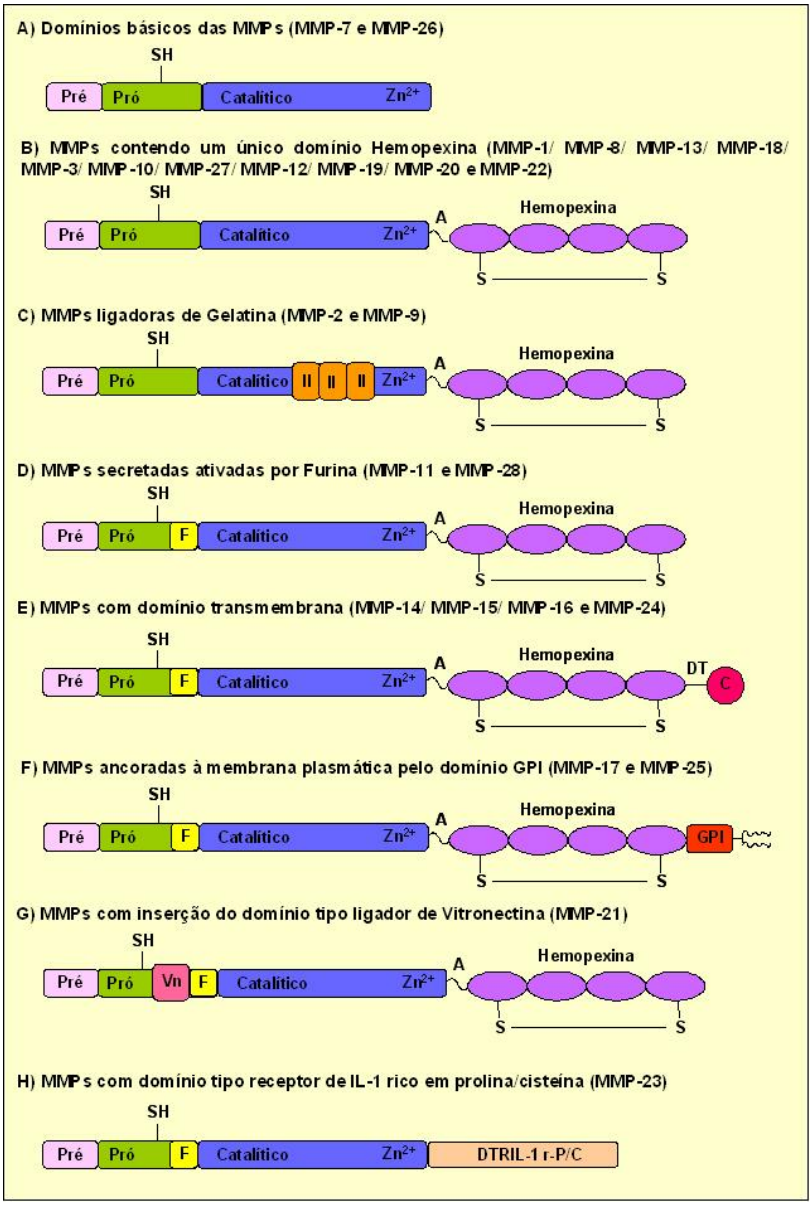


Figura 2.2 Domínios das MMPs. Pré: segmento pré-peptídico sinal (N-terminal); Pró: segmento pró-peptídico com um grupamento tiol (SH) livre ligador de zinco (N-terminal); A: região da alça; F: sítio susceptível a atuação de enzimas tipo furina; DT: domínio transmembrana (C-terminal); C: cauda citoplasmática (C-terminal); GPI: domínio glicosilfosfatidilinositol ancorado a membrana plasmática (C-terminal); Vn: domínio tipo vitronectina/ hemopexina contendo 4 repetições, sendo que a primeira e a última estão ligadas por ponte dissulfeto; DTRIL-1 r-P/C: domínio tipo receptor de IL-1 (interleucina-1) rico em prolina/cisteína (C-terminal) . Adaptado de Sternlicht, (2001)

ao nível protéico via seus ativadores e inibidores e interação com componentes específicos da MEC (Nagase; Woessner Jr, 1999; Sternlicht et al., 2001).

A expressão gênica destas enzimas é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas vias de sinalização. Por exemplo, a expressão de várias MMPs pode ser regulada positiva e negativamente por ésteres de forbol, sinais derivados de integrinas, proteínas da MEC, estresse celular e alteração na morfologia (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht et al., 1999). A expressão é ainda regulada por hormônios, fatores de crescimento, oncogenes e citocinas, tais como interleucinas, interferons, EGF (*epidermal growth factor*), KGF *(keratinocyte growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF *(platelet-derived growth factor*), TNF-α (*tumor necrosis factor-alpha*), TGF-β (*tumor growth factor-beta*) e EMMPRIN/CD147 (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (Fini et al., 1998). Muitos destes estímulos induzem a expressão e/ou ativação de produtos dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, os quais se heterodimerizam e ligam-se aos sítios do ativador de proteína 1 (AP-1) onde se encontram vários genes promotores das MMPs. Embora o complexo AP-1 desempenhe uma importante função na regulação de diversos genes das MMPs, outros fatores também estão envolvidos. Em alguns casos, um sinal pode coordenadamente regular alguns genes de MMPs e diferencialmente regular outros, como acontece com o TGB-β, retinóides e glicocorticóides (Benbow; Brinckerhoff, 1997). Existem também evidências que sugerem que membros ou grupos da família das MMPs são regulados independentemente (Brown et al., 1990; Vincenti et al., 1998).

Tradicionalmente, a função biológica das MMPs têm sido associada a degradação e turnover da maioria dos componentes da MEC. Este equívoco funcional tem sido utilizado por anos para explicar o envolvimento das MMPs nos processos de desenvolvimento, homeostase e doenças, levando a utilização de inibidores de MMPs em testes clínicos para o tratamento do câncer sem sucesso, levantando a questão se elas realmente podem ser alvos terapêuticos. Recentes estudos utilizando estudos de degradômica e proteômica em modelos de animais knockout para as MMPs tem mudado o dogma sobre as funções das MMPs, tendo funções dúbias tanto como protetoras como deletérias para os tecidos dependendo do processo biológico envolvido. As MMPs tiveram seus alvos proteolíticos específicos ampliados, incluindo outras moléculas da superfície celular e proteínas

pericelulares não relacionadas à MEC, atuando assim na regulação do comportamento celular em várias vias, principalmente ao nível da sinalização celular. Estas incluem outras proteinases, substratos intracelulares, inibidores de proteinases, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes (pró-TGF-β, entre outros), proteínas ligadas a fatores de crescimento, receptores ancorados à membrana plasmática (integrinas, CD44, etc) e moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz (Bauvois, 2012; Butler; Overall, 2009; Lopez-Otin et al., 2009; Mannello; Medda, 2012; Rodriguez et al., 2010).

A maioria das MMPs ocupa papel central em condições fisiológicas normais (tais como diferenciação de células-tronco, proliferação, mobilidade celular, remodelação, cicatrização, angiogênese e apoptose) (Malemud, 2006; Mannello et al., 2005; Mannello et al., 2006) (Quadro 2.2) e a perda do balanço entre as MMPs e seus inibidores tem implicado em várias condições patológicas (tais como invasão tumoral, fibrose, etc) através de diferentes mecanismos, principalmente ligados a destruição tecidual, fibrose e alteração da composição da MEC (Gialeli et al., 2011; Kessenbrock et al., 2010; Malemud, 2006). A superexpressão das MMPs em uma grande variedade de tumores malignos têm sido correlacionada à agressividade tumoral, estadiamento e fator prognóstico (Kessenbrock et al., 2010).

2.2.2 Inibidores das MMPs

O balanço entre as MMPs e seus inibidores é um pré-requisito necessário para o funcionamento de eventos fisiopatológicos envolvendo a remodelação da MEC (desenvolvimento, morfogênese, remodelação tecidual, inflamação, doenças degenerativas, crescimento tumoral, invasão e metástase) (Hadler-Olsen et al., 2011).

As MMPs podem ser inibidas reversivelmente por seus inibidores fisiológicos (TIMPs) (Bauer et al., 1975), irreversivelmente pela α2-macroglobulina (serina proteinase que é a maior inibidora das MMPs do plasma sanguíneo) (Sottrup-Jensen; Birkedal-Hansen, 1989), pela PZP (*pregnancy zone protein*) (Arbelaez; Stigbrand, 1997) (Arbeláez et al., 1997), pelo domínio NC1 (produto da clivagem da

extremidade C-terminal do colágeno tipo IV) (Netzer et al., 1998), pela TFPI-2 (*tissue factor*

MMPs	Efeito biológico	Substrato Clivado
1	Reepitelização e migração de queratinócitos	Colágeno tipo I
13	Ativação de osteoclastos	Colágeno tipo I
2	Desenvolvimento de neurite	Proteoglicano sulfato de condroitina
7	Diferenciação de adipócitos	Fibronectina
1, 2, 3	Migração celular	Fibronectina
14	Migração celular	CD44
3	Apoptose de células epiteliais mamárias	Membrana basal
3	Formação do epitélio alveolar mamário	Membrana basal
3	Transição epitélio-mesênquima (células epiteliais mamárias)	E-caderina
2	Diferenciação de células mesenquimais com fenótipo inflamatório	
1	Agregação plaquetária	
3, 7, 9, 12	Geração de fragmentos tipo-angiostatina	Plasminogênio
Todas	Geração de fragmentos tipo-endostatina	Colágeno tipo XVIII
2, 3, 7, 9, 13	Afinidade maior por colágeno	BM-40 (SPARC / osteonectina)
14	Tubulogênese renal	Colágeno tipo I
3, 13	Liberação de bFGF	Perlecana
1, 2, 3, 7 e 19	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-3
Todas	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-5
11	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-1
Todas	Ativação de VEGF	CTGF
2, 14, 19	Migração de células epiteliais	Cadeia de laminina 5γ2
14	Migração de células epiteliais	Laminina 5γ3
Colagenases	Apoptose (células epiteliais amnióticas)	Colágeno tipo I
1, 3, 9	Pró-inflamatória	Processamento do IL-1β a partir do precursor
9	Resistência de células tumorais	ICAM-1
1, 2, 3, 13, 14	Antiinflamatória	Proteína-3 quimiotáxica de monócitos
1, 2, 9	Antiinflamatória	Degradação de IL-1β
2, 3, 7	Aumento do bioviabilidade de TGF-β	Decorina
3, 7	Agregação celular desagregada e aumento da invasão celular	E-caderina
14, 15, 16	Diminuição da adesão cellular e spreading	Transglutaminase tecidual da superfície celular
7	Apoptose mediada pelo receptor de Fas	Ligante Fas
7	Pró-inflamatória	Pró-TNFα
7	Ativação de osteoclastos	Ligante RANK
9	Diminuição da resposta IL-2	IL-2Rα

1	Ativação PAR1	Receptor 1 ativador de protease
2	Geração de vasoconstrictor	Endotelina
2	Conversão de vasodilatador em vasoconstritor	Adrenomedulina
7	Vasoconstrição e crescimento cellular	Ligante heparina EGF
2	Apoptose neural determinando neurodegeneração	Fator 1α (SDF-1) estromal derivado de células
9	Bioviabilidade de TGFβ	Precursor de TGFβ
9	Neovascularização do timo	Colágeno tipo IV
9	Apoptose de condrócitos hipertróficos e recrutamento de osteoclastos	Galactina-3
14	Aderência do embrião ao epitélio uterino	MUC1, mucina transmembrana

Fonte: Nagase et al. (2006).

Quadro 2.2 Efeitos biológicos mediados pela MMPs em situações fisiológicas

pathway inhibitor 2) (Herman et al., 2001), pela CT-PCPE (*carboxy-terminal fragment of procollagen carboxy-terminal proteinase enhancer*), que apresenta um segmento C-terminal, que tem atividade inibidora de MMPs, com similaridades estruturais com o domínio N-terminal das TIMPs (Mott et al., 2000), pela proteína precursora da β-amilóide ligada a membrana (Miyazaki et al., 1993), pela trombospondina-2 (Yang et al., 2001) e pela glicoproteína RECK que é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana plasmática (Takahashi et al., 1998) .

2.2.2.1 Inibidores Teciduais das MMPs (TIMPs)

As TIMPs são conhecidas como sendo os inibidores fisiológicos de todos os membros da família das MMPs (TIMPs 1-4). Estas apresentam de 37-51% de homologia na seqüência primária, mas exibem distintos perfis estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão (Quadro 2.3). São proteínas pequenas, de aproximadamente 21 kDa de peso molecular e variavelmente glicosiladas. Estas moléculas são compostas por dois domínios: (I) um domínio N-terminal, com cerca de 125 resíduos de aminoácidos, ligado a um oligosacarídeo/oligonucleotídeo, que representa dois terços da molécula, o grande *three-loop*; e (II) um pequeno domínio C-terminal com cerca de 65 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma estrutura secundária rica em folhas β-pregueadas, entretanto, pouco elucidada, o pequeno *three*-loop

	TIMP-1	**TIMP-2**	**TIMP-3**	**TIMP-4**
Peso Molecular (kDa)	28	21	24/27	22
Locais de N-glicosilação	2	-	Parcial	-
Localização da Proteína	Solúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular	Insolúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular
Associação com pró-MMPs	Pró-MMP-9	Pró-MMP-2	Pró-MMP-9/ Pró-MMP-2	Pró-MMP-2
MMPs inibidas	MMP-9	Todas	Todas	Maioria
MMPs fracamente inibidas	MMP-14 MMP-16 MMP-19 MMP-24	-	-	-
Proliferação Celular	↑ Precursores Eritrocitários ↑ Células Tumorais	↑ Precursores Eritrocitários ↑ Células Tumorais ↑ Fibroblastos ↑ Células de Músculo Liso ↓ Células Endoteliais	↑ Células de Músculo Liso e Células Tumorais*	↑ Células Tumorais de Mama ↓ Células Tumorais de Wilm
Apoptose	↓ Células do Linfoma de Burkitt	↑ Células Tumorais Cólon-retais ↓ Melanoma	↑ Células de Músculo Liso ↑ Células Tumorais ↑ Células do Epitélio Pigmentado da Retina	↑ Fibroblastos Cardíacos
Angiogênese Tumoral	↑ Mama ↓ Fígado	↓ Melanoma ↓ Mama	↓ Melanoma	-
Angiogênese em colágeno 3D/gel de fibrina	Sem efeito	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Tumorigênicos	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Metastásicos	Estimula	-	-	Estimula

Fonte: Apte et al. (1995); Sato et al. (1996); Will et al. (1996); Bigg et al. (1997); Liu et al. (1997); Baker et al. (2002); Chirco et al. (2006); Brew ; Nagase (2010)

Quadro 2.3 Classificação, propriedades bioquímicas e atuações biológicas das TIMPs

(Gomis-Ruth et al., 1997; Tuuttila et al., 1998; Williamson et al., 1994). A conformação tridimensional apresenta, então, 6 *loops* formados pelas 12 cisteínas que estabelecem as 6 pontes dissulfeto (Murphy et al., 1993; Williamson et al., 1994). As TIMPs são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular associadas a proteínas de membrana ou associadas a moléculas da MEC (Pavloff et al., 1992).

Além de sua função de inibidores das MMPs, as TIMPs exercem diversas atividades biológicas independentes das funções de inibidores das MMPs, tais como modulaçãoo da proliferaçãoo celular, migraçãoo e invasão, anti-angiogênicas e plasticidade sináptica. Estas funções podem ser originadas do processo de inibição das MMPs, como a regulação do catabolismo da MEC pode influenciar o comportamento celular, mas, a maioria deles, tem sido observados de forma independente, através da interação direta com receptores da superfície celular específicos que induzem respotas celulares (Stetler-Stevenson, 2008).

Os animais que não possuem os genes das TIMPs são viáveis, apresentando alterações em diversos órgãos (Brew; Nagase, 2010). Animais mutantes para TIMP-2 não apresentam anormalidades anatômicas ou microscópicas e não perderam a capacidade reprodutiva, entretanto a ativação da pró-MMP-2 foi muito comprometida (Caterina et al., 2000), indicando que a sua função fisiológica especializada é a ativação da MMP-2 (Wang; keiser, 2000), já que estes animais apresentaram o mesmo fenótipo dos animais mutantes para a MMP-2 (Hayashi et al., 1997).

2.2.2.2 Inibidor das MMPs Ancorado a Membrana Celular (RECK)

O gene *RECK* foi inicialmente identificado pela capacidade de induzir a reversão fenotípica de uma linhagem de fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) transformada pelo oncogene *RAS* ativado (transformação *v*-Ki-*RAS*) (Takahashi et al., 1998). Este gene é altamente expresso em diversos órgãos humanos e em camundongos, mas baixa ou indetectável expressão em linhagens celulares tumorais, além de poder ser regulado negativamente por diversos oncogenes, incluindo o *Ras* e *myc* (Sasahara et al., 1999a; Sasahara et al., 1999; Takahashi et al., 1998).

RECK é um inibidor exclusivo das MMPs -2 (Takahashi et al., 1998) -9 (Oh et al., 2001a; Sasahara et al., 2002; Takagi et al., 2009) e MMP-14 (Oh et al., 2001; Sasahara et al., 2002) e, aparentemente, da MMP-7 (Omura et al., 2009) *in vitro* e *in vivo*. O exato mecanismo molecular envolvido na regulação da secreção das MMPs e/ou da regulação da atividade enzimática por RECK ainda permanecem sem resposta, mas interações diretas proteína-proteína são requeridas, entretanto a estequiometria envolvida nestes eventos é desconhecida. Camundongos *knockout* para RECK (*RECK*$^{-/-}$ e *RECK*$^{+/-}$) demonstraram que a maioria dos embriões homozigotos para a deleção morreram aos 10,5 dias de vida intra-uterina (E10,5) e o restante não ultrapassou os 11,5 dias de vida (E11,5). A análise histológica revelou que os tecidos mesenquimais apresentaram severo desarranjo na arquitetura tecidual, anormal organogênese principalmente ao nível da angiogênese, pois o sistema vascular foi formado, mas as células endoteliais não eram capazes de formar túbulos.

Além disso, estes animais apresentaram altos níveis de MMP-2 ativa, entretanto, a pró-MMP-9 não foi detectada, e intensa degradação da MEC, principalmente na redução significativa de colágeno tipo I, comparado aos níveis em mutantes heterozigotos ou em indivíduos normais. Camundongos com dupla deleção para RECK/MMP-2 (*MMP-2*$^{-/-}$ *e RECK*$^{-/-}$) sobreviveram 1 dia a mais que os animais *RECK*$^{-/-}$e apresentaram perfil anatômico e histológico parecidos, mas menos severos.

Com isso, muitas evidências sugerem que a desregulação das MMPs pode ter colaborado, em grande parte, para o fenótipo encontrado em camundongos *RECK*$^{-/-}$. Em camundongos normais (E10,5), RECK foi detectado em células ao redor de vasos sanguíneos (mais em células murais do que em células endoteliais), alta expressão ao redor do tubo neural e moderada no mesênquima e nos somitos, justamente no tecidos mais afetados nos animais *RECK*$^{-/-}$ (Oh et al., 2001).

A descoberta de que o colágeno tipo I é a proteína mais afetada em animais *RECK*$^{-/-}$ e que camundongos homozigotos mutantes para o gene do *colágeno α1(I)* também morrem *in utero* pela ruptura de grandes vasos sanguíneos (Lohler et al., 1984), sugere que RECK pode ser um regulador da remodelação da MEC através do controle da via de sinalização de Ras. Camundongos *knockout* para GAP, um regulador negativo de Ras, apresentam defeitos similares durante a angiogênese embrionária (Henkemeyer et al., 1995).

2.3 INTERFACE MATRIZ EXTRACELULAR-CÉLULA

2.3.1 Cavéola e Caveolinas

A cavéola é um microdomínio de membrana, em forma de ômega (Ω), caracterizada por invaginações de aproximadamente, 50-100 nm presentes na membrana plasmática (Figura 2.2) (Palade, 1953; Yamada, 2001). Esta localizada em uma região rica em colesterol e esfingolipídios conhecida como jangada lipídica (“lipid rafts”) (Simons;Toomre, 2000). Cavéolas são visualizadas através de microscopia eletrônica de transmissão e podem ser encontradas sozinhas ou em complexos abrigando várias cavéolas, formando uma estrutura que lembra um “cacho ou uma rosa” (“rosetta-like”) (Figura 2.3) (Dvorak, Feng, 2001; Fang et al., 2006; Pelkmans et al., 2001; Stahlhut; Van, 2000; van et al., 2003). Esta estrutura é encontrada em diferentes proporções em diversos tipos celulares, sendo mais evidente em adipócitos, células epiteliais, endoteliais, pneumócitos tipo I, células musculares e fibroblastos (Chidlow, Jr.; Sessa, 2010), porém, aparentemente, ausentes em hemácias, plaquetas e linfócitos (Echarri et al., 2012). Desde de a sua descoberta, esta região especializada da jangada lipídica vem sendo relacionada a diversos mecanismos celulares importantes, tais como a endocitose, transcitose, pinocitose, sinalização de cálcio, sinalização celular, metabolismo de lipídios, crescimento celular e na apoptose. O principal componente estrutural da cavéola é uma proteína integral de membrana conhecida como caveolina (Kurzchalia et al., 1992; Rothberg et al., 1992).

Em mamíferos são encontrados três genes de caveolina: Caveolina-1 (Cav-1), Caveolina-2 (Cav-2) e Caveolina-3 (Cav-3) (Echarri et al., 2012; Williams; Lisanti, 2004). Cav-1 é expressa em diversos tipos celulares, mas em evidência em adipócitos, fibroblastos, pneumócitos, células epiteliais e endoteliais, neurônio e células da glia e células do músculo liso (Cohen et al., 2003). Normalmente, Cav-2 é co-expressa com Cav-1 (Scherer et al., 1995). Cav-3 é expressa em tecido muscular esquelético e músculo cardíaco e co-expressa com Cav-1 em células do músculo liso (Song et al., 1996; Williams; Lisanti, 2004; Yamagushi; Yoshida, 2012). A Cav-1

é a mais abundante e é apontada como a principal responsável pela formação da estrutura caveolar (Jin et al., 2011).

A Cav-1 é uma proteína integral de membrana de 21-24 kDa, possui um ancoramento incomum na face interna da membrana plasmática onde as extremidades amino-terminal e carboxiterminal estão voltados ao citoplasma e são ancoradas através de ganchos hidrofóbicos formados por 33 aminoácidos (Murata et al., 1995). Cav-1 é sintetizada no retículo endoplasmático, transportadas ao complexo de Golgi, onde é secretada como oligômero e se associa aos glicoesfingolipídios e colesterol e, finalmente, direcionados à membrana plasmática onde iram se fundir (Fra et al., 1995; Pol et al., 2005). Esta proteína está na interface entre os sinais vindos da matriz extracelular (MEC) e o estímulo ou repressão desencadeados intracelularmente, sendo um importante centro de sinalização para o óxido nítrico (NO), cálcio, GTPases, proteína quinase C, H-Ras, receptores acoplados a proteína G e proteínas tirosina quinase e não-tirosina quinase ou como porta de entrada de vírus. Atua também na internalização de diversas proteínas, toxina colérica, proteínas ancoradas a superfície celular via GPI (glicosilfosfatidilinositol), receptor de endotelina e de fatores de crescimento (por exemplo, IGF, EGF, TGF-, VEGF e BMPs) (Chen, 2009; Chidlow, Jr. Sessa, 2010; Lajoie et al., 2009).

Cav-1 é expressa em duas isoformas, Cav-1α e Cav-1β, que apresentam respectivamente 178 e 147 aminoácidos, tendo seu início na metionina 1 (Cav-1α) e metionina 32 (Cav-1β). Ambas as isoformas possuem um domínio hidrofóbico presente na extremidade C-terminal, enquanto a extremidade N-terminal com 31 aminoácidos esta presente apenas na Cav-1α. As duas isoformas normalmente estão presentes em sobreposição, mas isso pode variar em determinados tipos celulares (Scherer et al., 1995). Inicialmente, a presença das isoformas de Cav-1 foram relacionadas com a formação e a profundidade da estrutura caveolar (Fujimoto et al., 2000), porém a supressão da expressão das duas isoformas resulta na ruptura da actina do citoesqueleto (Fang et al., 2006). A Cav-1 é substrato da Src quinase e, apenas a Cav-1α, apresenta o sítio de fosforilação na tirosina 14 (pY14Cav1), regulando a sua interação com integrinas, vários adaptadores das vias de sinalização e proteínas tirosina fosfatases. A habilidade da pY14Cav1 em induzir a organização de microdomínios com adesão focal bem como estabilizar a adesão

focal mediada por FAK (“focal adhesion kinase”), implica na promoção e turnover desta via de sinalização (Nethe; Hordijk., 2011).

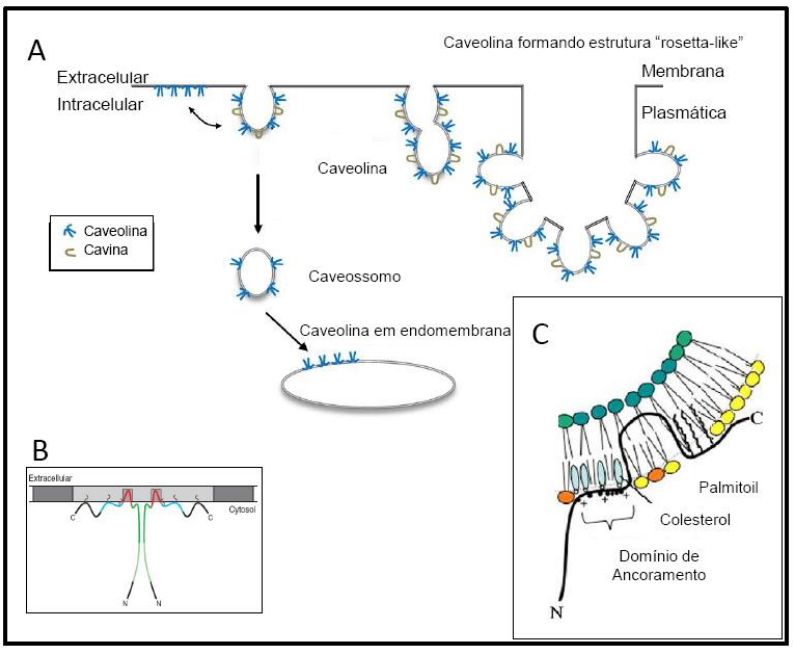


Figura 2.3 Esquema ilustrando a presença de caveola : (A) da esquerda para a direita, proteína caveolina ancorada na membrana plasmática: formação da estrutura caveolar; “cluster “de cavéola; formação de estrutura “rosetta-like”; endocitose da cavéola e formação do caveossomo (adaptado de Echari e Del Pozo, 2012). (B) Topologia da proteína caveolina ancorada na membrana plasmática. Dímero de Cav-1 demonstrando em vermelho o domínio de ancoramento , em preto as extremidades N-terminal e C-terminal; A membrana plasmática em cinza escuro e em cinza claro Colesterol e esfingolipideos (adaptado de Hnasko; Lisanti 2003. (C) Detalhe do ancoramento da caveolina (adaptado de Parton et al., 2006).

Muitas disfunções fisiológicas têm sido observadas em animais com deleção do gene da Cav-1 em diversos órgãos e tecidos diferentes, sendo a ausência da estrutura caveolar a característica comum em todos os casos. Além disso, a diminuição na expressão das proteínas GPI ancoradas e c-Src tirosina quinase também foram observadas (Sotgia et al., 2005). No tecido adiposo, a sua ausência causa defeitos na homeostase lipídica, acarretando resistência à obesidade induzida por dieta e possuem, ainda, diminuição na capacidade de eliminar os lipídios, demonstrando um quadro hipertrigliceridêmico (Razani; Lisanti 2001). Além disso, níveis elevados de cálcio na urina e presença de cálculos renais são observados devido a diminuição da reabsorção tubular (Cao et al., 2003). No coração, a falta de

Cav- 1 resulta em hipertrofia cardíaca e a atividade da eNOS (“endothelial nitric oxide synthase”) não responde a sinais de regulação negativos, acarretando em seu acúmulo intracelular (Cohen et al., 2003). Além disso, hiperproliferação de células endoteliais e anormalidades vasculares foram também observadas (Razani;Lisanti, 2001). No tecido ósseo tanto a cavéola quanto a Cav-1 tem sido descritas em osteoblastos (Lofthouse et al., 2001; Solomon et al., 2000a; Solomon et al., 2000b), condrócitos (Boyan et al., 2006; Hollins et al., 2002; Schwab et al., 1999a; Schwab et al., 1999b; Schwab et al., 2001) e animais Cav-1$^{(-/-)}$ apresentam aumento da densidade óssea (Rubin et al., 2007) e em casos de osteoartrite o aumento da expressão de Cav-1 leva a senescência destas células (Yudoh et al., 2009). No cérebro, a perda da expressão da Cav-1 leva a aceleração da neurodegeneração e é um novo modelo não-mutacional de estudo do mal de Alzheimer (Head et al., 2010)

A função da Cav-1 em células-tronco parece estar associada tanto na manutenção de seu estado indiferenciado (“self-renewal”) quanto na proliferação e migração (Lee et al., 2009; Lee, SH et al., 2010; Park et al., 2009a; Park et al., 2009b; Park et al., 2011). Lee e et al (2010) demonstraram que Cav-1 é importante para a eficiência da manutenção do estado de indiferenciado e na regulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular de células-tronco embrionárias de camundongos (Lee MY, 2010). Cav-1 é importante na promoção de diferenciação de células-tronco neurais em células astrogliais devido a regulação da expressão de Notch e Hes1, proteínas importantes para proliferação e inibição da diferenciação de células-tronco neurais (Li et al., 2011). Corroborando com a primeira hipótese, estudos demonstraram: (I) que a deficiência da Cav-1 aumenta a população de células-tronco na mama (Sotgia et al., 2005); (II) causa hiperproliferação de células-tronco da cripta intestinal (Li et al., 2005); e (III) que células-tronco-mesenquimais originárias da medula óssea de ratos com deleção do gene da Cav-1 apresentaram retardamento na diferenciação adipogênica e osteogênica (Case et al., 2010). Por outro lado, o excesso de Cav-1 leva ao aceleramento da senescência celular (Park et al., 2005; Volonte et al., 2002). Estes trabalhos têm em comum a descrição da participação da Cav-1 nas vias de sinalização de Notch, integrinas, Wnt-catenina, MAPKs e Ras.

As DPSCs vem sendo amplamente estudadas nos últimos anos, principalmente, para a regeneração óssea (Seong et al., 2010) e dentária

(Casagrande et al., 2011). Entretanto, a função da Cav-1 no comportamento das DPSCs ainda é desconhecida.

Cavéola é microdominio de membrana, atuando como uma plataforma de comunicação, atraindo e regulando proteínas de sinalização através da capacidade de interação entre estas proteínas e Cav-1 (Cohen et al., 2004; Inokuchi, 2006; Parton et al., 2006). A proteína Cav-1 foi co-localizada com a EMMPRIN/CD147, atuando como um regulador negativo da sinalização de EMMPRIN/CD147 (Schwab et al., 2007a). Cav-1 vem sendo relacionada com algumas MMPs, exercendo uma regulação negativa na expressão da MMP-1 via inibição da sinalização do gene Erk1/2 e Ets1 (Haines et al., 2011) e na formação do “cluster” de EMMPRIN/CD147 em células de fibroblastos humano em cultura primária (Tang; Hemler, 2004). A EMMPRIN/CD147 foi encontrada nas jangadas lipídicas, co-localizada com Cav-1 e a secreção das MMPs foram associados a importantes eventos de diferenciação nas células epiteliais dentárias (Schwab et al., 2007; Xie et al., 2010). Galvez e et al. (2004) demonstraram que a cavéola pode atuar na internalização da MT1-MMP (MMP-14), que é importante para a angiogênese entre outras funções (Seiki, 2002).

Neste contexto, a correlação entre as modificações que ocorrem na MEC ocasionadas pelas MMPs (e reguladas por seus inibidores ou ativadores) e seus efeitos nas vias de sinalização (que acarretarão alterações no comportamento celular) não são conhecidos em células-tronco (tão pouco em DPSCs) e nem de que forma isto ocorre ao nível da membrana plasmática (sinalização da MEC para célula ou vice-versa) que pode estar sendo controlada nas jangadas lipídicas (cavéola e caveolinas).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica de enzimas que remodelam a matriz extracelular (metaloproteinases de matriz) e seus inibidores (inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz e RECK) e proteína da membrana plasmática (caveolina-1) que participa de vias de sinalização durante a diferenciação celular *in vitro* a partir de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana.

Para tanto, nós tivemos como objetivos específicos:

1. Indução de multi-diferenciação em células-tronco da polpa dentária humana adulta (osteogênica e adipogênica);
2 Perfil de expressão das MMPs, seus inibidores (TIMPs e RECK) e Caveolina-1 por PCR em tempo real na diferenciação osteogênica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os dentes de adultos humanos utilizados nesta pesquisa estão sendo coletados junto a Divisão de Odontologia do Hospital Universitário da USP (Protocolo do Comitê de Ética do HU/USP aprovado em anexo - Registro CEP-HU/USP: 1141/11 – SISNEP CAAE: 0030.0.198.000-11 – Anexo A). Dentes saudáveis (sem cárie ou doença periodontal) com indicação de remoção cirúrgica (terceiros molares inclusos, semi-inclusos ou erupcionados e ou outros dentes) estão sendo obtidos depois de informado e obtido o consentimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente.

4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA (DPSCS)

As DPSCs foram extraídas segundo o protocolo de Gronthos e colaboradores (Gronthos et al., 2000) ou adaptação dos próprios autores (Gronthos et al 2011). Os dentes extraídos foram limpos com solução de clorexidina e então é feito um corte na junção amelo-cementária (JAC), revelando a cavidade pulpar (procedimento realizado pelos Cirurgiões Dentistas residentes do programa de residência em Cirurgia Buco-Maxilo-facial do Setor de Odontologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo). A polpa foi delicadamente separada da coroa e da raiz dentária e submergida em meio de transporte com antibiótico 2X concentrado (α-MEM e antibiótico penicilina 100U/ml e estreptomicina 100mg/ml).

Inicialmente, as polpas foram dissociadas mecanicamente e, posteriormente, os fragmentos celulares foram desagregados enzimaticamente, através da incubação em solução de digestão contendo Colagenase Tipo I – 3 mg/ml ou 6 mg/mL (17100-017, Gibco) e Dispase 4 mg/ml ou 8 mg/mL (17105041, lote: 1000230, Gibco) por 1 hora a 37°C em banho-maria. Após este período, a remoção desta enzimas foi realizada por centrifugação. O pellet celular formado foi lavado com solução salina PBSA e, novamente, centrifugada a 800 rpm por 5 minutos. Este, então, foi ressuspenso e filtrado em filtro de 70µm (BD Biosciences) para

obtenção de “single cells”. As células obtidas foram então cultivadas em meio α-MEM (“α-Modified Minimal Essential Medium”) com 2 mM glutamina e suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 µM de L-ácido ascórbico 2-fosfato, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e mantidas em garrafas plásticas aderentes (T25cm²-TPP). Após 48 horas o meio foi trocado a fim de minimizar a incidência de contaminação por outros tipos celulares presentes na polpa dentária, e foi possível a visualização da formação de colônias celulares após 3 dias. Após 14-15 dias, estas culturas primárias foram tripsinizadas e expandidas até a passagem P4 para a caracterização e realização dos experimentos (Figura 4.1).Para os experimentos, nós utilizamos células de 3 pacientes diferentes, segundo a Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Informações sobre os pacientes das DPSCs utilizadas neste trabalho

Paciente	Idade	Sexo	Tipo de dente	Protocolo de Isolamento
12	32 anos	Masculino	3°Molar não-erupcionado	Gronthos et al 2000
13	27 anos	Masculino	3°Molar não-erupcionado	Gronthos et al 2000
30	18 anos	Feminino	3°Molar não-erupcionado	Gronthos et al 2011

4.2 CITOMETRIA DE FLUXO

Para a confirmação do fenótipo das DPSCs, foi utilizado o equipamento FACSÁria II SORP (“Fluorescente activated cell sorting”, BD). As células na P4 foram desagregadas em solução de Versene (EDTA 0,5M (pH 8,0) 10x diluído em PBSA) por 30 min a 4°C, sob agitação, e, posteriormente as células desagregadas foram centrifugadas em temperatura ambiente, fixadas em paraformaldeído a 4% e incubadas com uma solução de bloqueio (5% BSA, 0,01 TRITON X-100 em PBSA). Após este período, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e, para cada tubo, utilizamos $1x10^6$ células. Para a imunofenotipagem utilizamos como marcadores positivos (inclusão) a STRO-1, CD90, CD105, CD45, CD29, CD44 e

marcadores negativos (exclusão) CD34, CD14, CD31, CD15, CD73, IgG1, o que as definem como células-tronco mesenquimais e elimina a possibilidades de serem células-tronco precursoras hematopoiéticas, segundo os parâmetros estabelecidos pela “Internacional Society for Cell Therapy” (Dominici et al., 2006) (Quadro 4.1).

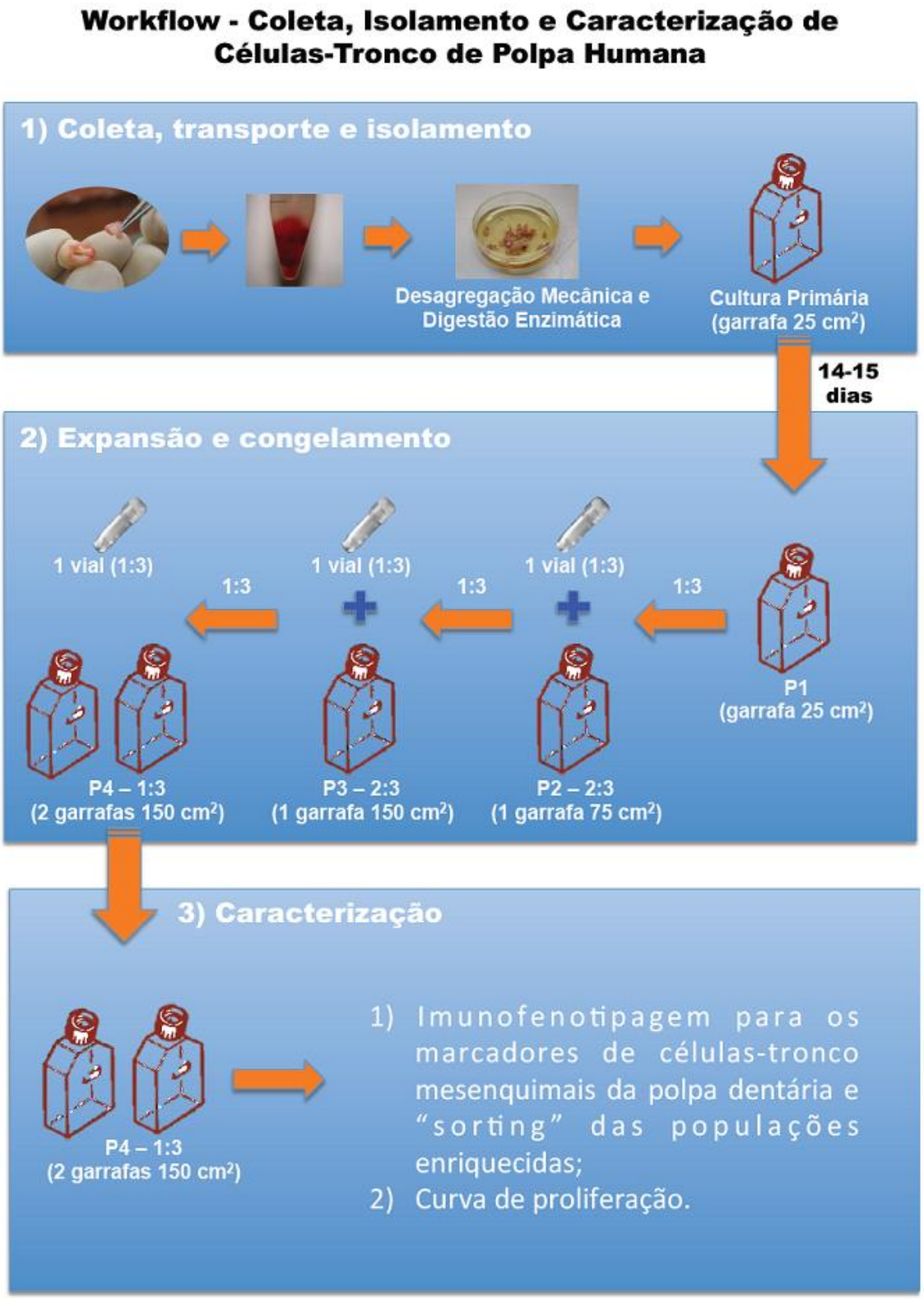


Figura 4.1 Fluxo de trabalho ("workflow") desde a coleta da polpa dentária até a caracterização das células-tronco da polpa dentária na passagem 4

Anticorpo	Marca	Código	Diluição	Anticorpo Secundário	Fluoróforo Conjugado	Tipo Celular	Localização	Função
STRO-1	Abcam	ab102969	1:100	Anti-mouse (FITC ou PE)	FITC	MSC	Superfície celular	Seleção de células STRO-1^{+} auxilia o isolamento de MSC
CD90 (Thy-1)	BD	561969	1:200	Anti-mouse (FITC) -	FITC	HSC, MSC	Superfície celular	Proteína pouca ou ausente em HSC
CD105 (endoglina)	Abcam	Ab2529	1:100	-	FITC	MSC	Superfície celular	Glicoproteína da superfície celular que faz parte do complexo do receptor de TGF-β e altamente expressa em células vasculares, condrócitos, sinciciotrofoblastos da placenta
CD45 (“leukocyte common antigen”)	BD	340942	1:200		APC	Linhagem de leucócitos	Superfície celular	Proteína em leucócitos e seus progenitores e ausente em HSC
CD29	BD	555443	1:200		PE	MSC	Superfície celular	Unidade de inetegrina β1
CD44	BD		1:200	-	APC	HSC, MSC	Superfície celular	Molécula de adesão celular presente em muitas células mesenquimais e em leucócitos em desenvolvimento e maduros
CD34	BD	550761	1:200	-	PEA	HSC, progenitores endoteliais , células-tronco musculares e células musculares satélite	Superfície celular	
CD14	BD	347493	1:200	-	FITC	Células endoteliais	Superfície celular	Componente do sistema imune inato expressa por macrófagos, neutrófilos granulócitos e células dendríticas
CD31 (PECAM-1)	BD	555445	1:200	-	FITC		Superfície celular	Família das imunoglobulinas em plaquetas, monócitos, neutrófilos,

								endoteliais e algumas células T
CD15 (“Stage-specific embryonic antigen-1”/SSEA-1)	BD	560997	1:200		- FITC	ESC, ECC	Superfície celular	Glicoproteína expressa especificamente em células no inicio do desenvolvimento embrionário
CD73	Abcam	Ab54217	1:750	Anti-mouse (FITC ou PE)	- FITC		Superfície celular	Enzima envolvida na diferenciação linfocitária e células endoteliais
IgG1	BD	340755,	1:200	Anti-mouse (FITC) --	FITC	Controle negativo	Superfície celular	Imunoglobulina
IgG2	BD		1:200	-	PEA	Controle negativo	Superfície celular	Imunoglobulina
Cav-1	Cell Siganaling	3238	1:100	Anti-rabbit (FITC ou PE)	-PEA		Superfície celular e intracelular	
FAK	Abcam	Ab40794	1:50	Anti-rabbit (FITC ou PE)	-		Intracelular	Proteína tirosina quinase envolvida na adesão celular
EMMPRIN/CD147	Abcam	Ab78106	1:50	Anti-rabbit (FITC ou PE)	-		Superfície celular	Família das imunoglobulinas envolvido em eventos no desenvolvimento e diferenciação

HSC: células-tronco hematopoiéticas; MSC: células-tronco mesenquimais; ESC: células-tronco embrionárias; ECC: células de carcinoma embrionário.

Quadro 4.1 Descrição dos anticorpos utilizados em citometria de fluxo

4.3 CURVA DE PROLIFERAÇÃO

As células na passagem 4 foram plaqueadas (30.000 células/poço) em triplicata em placas de 24 poços, onde as células foram 24h após o plaquemanento (primeiro ponto – dia 1) e contadas por 10 dias consecutivos.

4.4 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

Para todas as diferenciações, as células foram plaqueadas na densidade de 5.000 células/cm^2 e, estando sub-confluentes (cerca de 2-3 dias depois) a indução das diferenciações (osteogênica e adipogênica) foram iniciadas. As validações das diferenciações foram analisadas por colorações específicas (Quadro 4.2). As induções da diferenciação foram avaliadas nos períodos experimentais de 1, 7, 14, 21e 28 dias. Os meios de indução foram trocados a cada 3 dias.

Diferenciação	Meio Diferenciação	Coloração
Osteogênica	α-MEM + 10% SFB + 1 µM dexametasona + 10 mM β-glicerofosfato + 50 µg/mL ácido ascórbico	Alizarina Red (visualizar a formação de nódulos de mineralização)
Adipogênica	α-MEM + 10% SFB + 100 nM dexametasona + 5 µg/mL insulina + 200 µM indometacina + 100 µg/mL IBMX	Oil Red (visualização de vesículas lipídicas intracelulares)

Quadro 4.2 Composição dos meios de indução das diferenciações odontogênica, adipogênica, osteogênica/odontogênica e o tipo de coloraçãoo específica utilizada.

4.5 PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

As amostras da diferenciação osteogênica foram coletas e lisadas pelo reagente TRIzol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA (1μg ou 500 ng) foi tratado com DNAse I (Invitrogen) e realizaremos a RT-PCR (oligodT, RNAseOUT e SuperScriptIII, Invitrogen). O cDNA sintetizado foi o molde utilizado para a reação pelo método do SYBR Green Dye I e a avaliação da expressão gênica relativa pelo método de Pfafil (2001), segundo o cálculo:

$$\textit{Expressão Relativa} = \frac{\textit{Eficiência}^{\Delta Ct\ alvo\ (\Delta Ct\ calibradora\ -\ \Delta Ct\ amostra)}}{\textit{Eficiência}^{\Delta Ct\ normalizador\ (\Delta Ct\ calibradora\ -\ \Delta Ct\ amostra)}}$$

Utilizamos o GAPDH como gene endógeno para a normalização das amostras. As amostras calibradoras foram as células-tronco não diferenciadas de cada paciente utilizado. As amostras sintetizadas a partir de 1μg de RNA foram diluídas 1:2 e as amostras sintetizadas a partir de 500 ng de RNA foram utilizadas puras. As reações foram realizadas em um volume total de 10 μL, contendo 1 μL de amostra, 10 pmol de cada primer (400 nmol), 5 μL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems) e água q.s.p. As reações foram realizadas no equipamento da Applied Biosystems (ABI 7300), a 60°C em 40 ciclos. Fizemos a avaliação da expressão gênica das MMPs (15 membros), TIMPs (-1, -2, -3 e -4), RECK, Cav-1 (Quadro 4.3). Os primers foram desenhados inter-éxon no software GeneTool 2.0.

4.6 Análise dos Resultados

Utilizamos o software GraphPad Prima 6 para a construção dos gráficos e análise estatística, onde submetemos os dados ao teste estatístico Two-way ANOVA e pós-teste Tukey. o critério de determinação de significância adotado foi de 5%, ou seja, quando o valor de *p* do teste estatístico é menor ou igual a 0,05 existe significância estatística.

Gene-Alvo	Número de Acesso (Pubmed)	Sequência dos primers (5´-3´)	Amplicon (pb)
MMP-1	NM_002421	F: acacgccagatttgccaaga R: cgatgatctcccctgacaaa	145
MMP-2	NM_004530	F: ccctcgcaagcccaagtg R: ggattcgagaaaaccgcagt	149
MMP-3	NM_002422	F: ttgctcagcctatccattgg R: ccactgtcctttctcctaac	132
MMP-7	NM_002423	F: gcgttcatcctcatcgaagt R: tgtatggggaactgctgaca	151
MMP-9	NM_004994	F: cagcgccagtccaccctt R: cccgagtgtaaccatagcg	103
MMP-10	NM_002425	F: gcccagcaatacctagaaaag R: cctccagagtgtcagtgtc	154
MMP-11	NM_005940	F: ctggcccactgtcacctc R: ggctccagcggtgcaatc	81
MMP-12	NM_002426	F: gatgcacgcacctcgatgt R: tgcgtagtcaacatcctcac	142
MMP-13	NM_002427	F: gcgctacctgagatcatact R: tcgtcaagtttgccagtcac	135
MMP-14/MT1-MMP	NM_004995	F: gcagaagttttacggcttgca R: tcgaacattggccttgatctc	100
MMP-15/MT2-MMP	NM_002428	F: cgggaggaagtggaacaac R: cagcccaacttctccgtgt	66
MMP-16/MT3-MMP	NM_005941	F: ggacagaaatggcagcacaa R: cggcgaatagctttacgagt	92
MMP-17/MT4-MMP	NM_016155	F: caccggcatcctggacga R: gggagcagcgtggggttt	56
MMP-25/MT6-MMP	NM_022468	F: agcggcagcgtgtggaag R: ccgcacggtctcctggct	87
MMP-28	NM_024302	F: ccccaaagctcccacctc R: gcagcggggacgagtcat	124
TIMP-1	NM_003254	F: ttaggggatgccgctgac R: caggtagtgatgtgcaagag	143
TIMP-2	NM_003255	F: aggaagtggactctggaaac R: gggggccgtgtagataaac	122
TIMP-3	NM_000362	F: ttcggcacgctggtctaca R: ttggtgaagcctcggtacat	56
TIMP-4	NM_003256	F: tcggcacttgtgattcggg R: gcatttttcagtgtcagcag	82
RECK	NM_021111	F: tgcaagcaggcatcttcaaa R: accgagcccatttcatttctg	100
Caveolina-1	NM_001753	F: ccctaaacacctcaacgatg R: gccttccaaatgccgtcaaa	96
GAPDH	NM_002046	F: gcatcctgggctacactga R: ccaccaccctgttgctgta	162

Quadro 4.3 – Sequências dos primers utilizados e o tamanho do fragmento amplificado (amplicon).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das DPSCs isoladas

As células isoladas dos 3 pacientes utilizados foram caracterizadas na passagem 4 e observamos um fase exponencial de proliferação acentuada após o 2° dia de contagem celular. As células dos pacientes 12 e 13 foram isolados utilizando a primeira metodologia e do paciente 30 com a adaptação das enzimas empregadas. Houve diferença estatisticamente significante entre o número de células dos pacientes 12 e 30 ($p<0.0001$) e 13 e 30 ($p<0.05$) do 4° ao 10° dia de proliferação (Figura 5.1). Assim, é possível que mais células tenham sido isoladas na cultura primária do paciente 30 do que nos demais e, por consequência, tendo um maior potencial proliferativo.

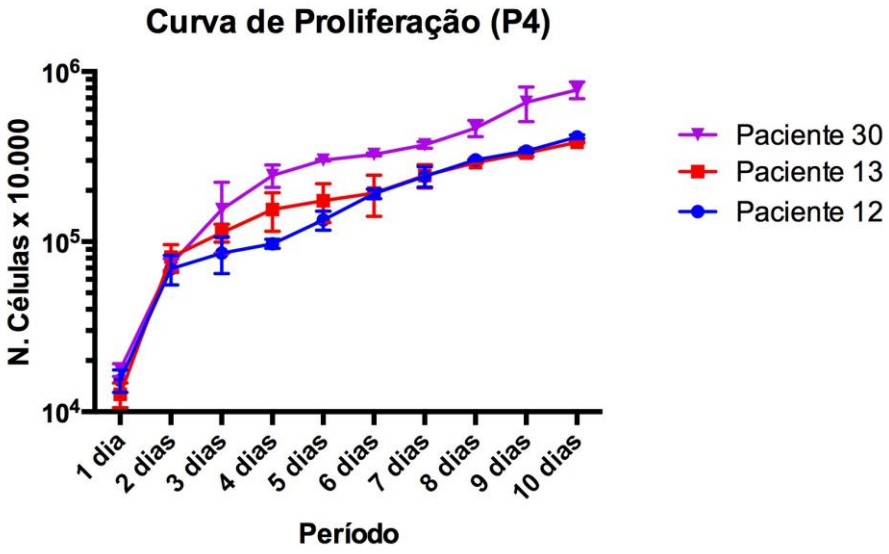


Figura 5.1 Curva de proliferação das DPSCs na passagem 4.

Nós encontramos o seguinte perfil de marcadores de membrana celular: (I) marcadores positivos, CD29 (11%), CD105 (37,1%), STRO-1 (1,02%), CD44 (30,8%), CD90 (93%) e para marcadores negativos: IgG1 (1,02%), CD31 (0,92%), CD34 (2,28%), CD45 (5,20%) e CD14 (0,52%), assim nós podemos estar trabalhando com células-tronco/progenitores mesenquimais com um fenótipo tipo-pericito, segundo relatado na literatura (Figura 5.2).

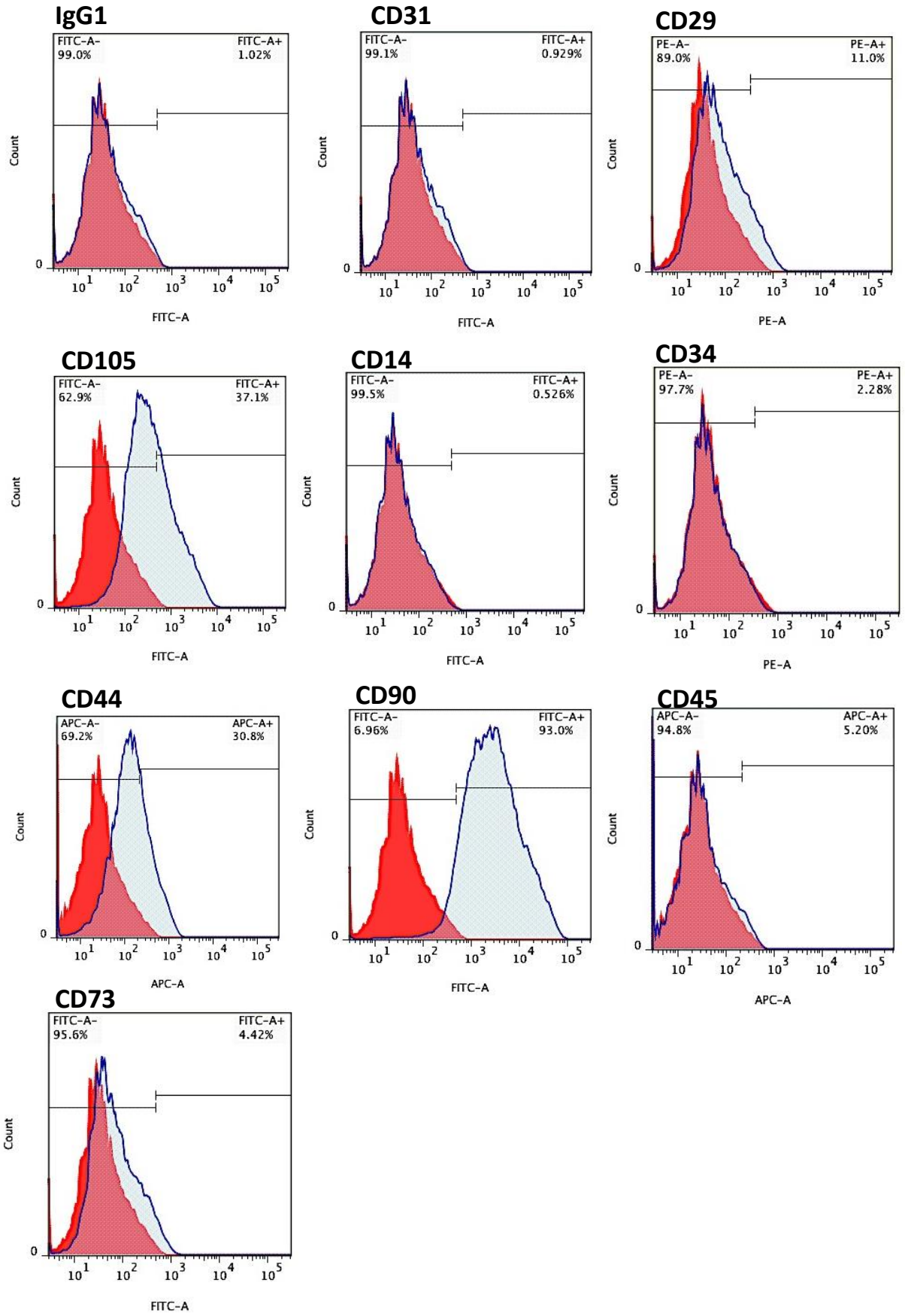


Figura 5.2 Imunofenotipagem das DPSCs na passagem 4.

5.2 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS DPSCS ISOLADAS

A validação da diferenciação das DPSCs foi verificada através das colorações específicas para cada tipo de indução de diferenciação. Observamos que houve um progressivo aumento de coloração ao longo dos períodos experimentais. As DPSCs isoladas se diferenciaram em tecido ósseo, como observado pela deposição de nódulos de mineralização evidenciado pela coloração vermelha (Figura 5.3B) bem como em tecido adiposo observado pela presença de vesículas com gotículas lipídicas evidenciado pela coloração vermelha (Figura 5.3C). Além disso, nós quantificamos a secreção da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação óssea e verificamos que houve um aumento do 1° ao 14° dia e diminuição do 14° ao 28° dia, sendo o perfil esperado para este tipo de diferenciação (Figura 5.4).

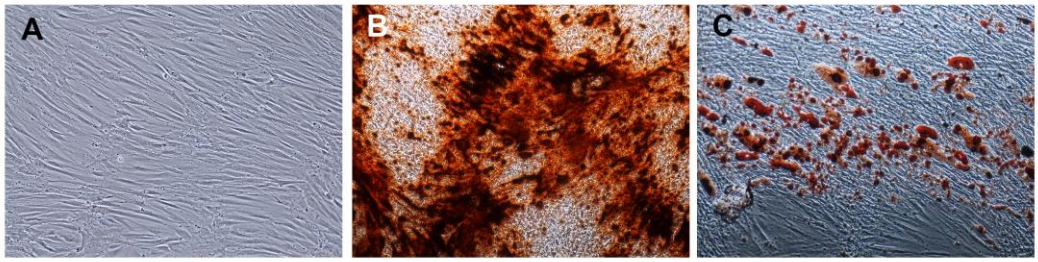


Figura 5.3 Fotomicrografias das DPSCs sem diferenciação e após a indução das diferenciações óssea e adipogênica (28 dias). (A) Aspecto morfológico fibroblastóide das DPSCs. (B) Coloração com alizarina vermelha e detecção de nódulos de mineralização em vermelho

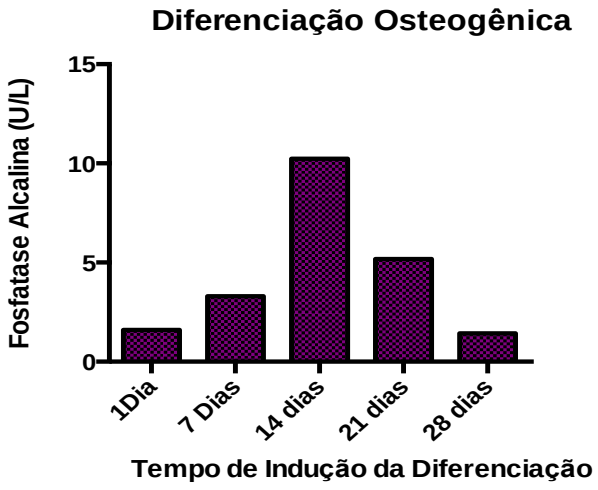


Figura 5.4 Quantificação da secreção da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação óssea em DPSCs.

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA

Alguns dos genes analisados nas DPSCs não diferenciadas estavam expressos ou não (considerando apenas o valor de Ct sem normalização com o gene endógeno) (Tabela 5.1). Os genes MMP-2, MMP-13, MMP-15, MMP-25, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e Caveolina-1 foram expressos em todos os pacientes e estes genes podem estar participando de algumas funções relacionadas ao estado indiferenciado das DPSCs.

Dentre estes, a MMP-11 não foi detectada em nenhuma das células dos 3 pacientes analisados e nem nos períodos de indução da diferenciação óssea.

Os genes das MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-28, TIMP-2 e RECK apresentaram dados divergentes entre os 3 pacientes analisados.

Durante a indução da diferenciação óssea, nós detectamos que as MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14, MMP-25, TIMP-3, TIMP-4 e Caveolina-1 tiveram o mesmo perfil de expressão nos 3 pacientes analisados, sendo reguladas negativamente do 1° ao 21° dia de indução da diferenciação e reguladas positivamente no 28° dia (Figura 5.5A, B, C, D, E, G, H e I). A TIMP-1 apresentou

um perfil diferente, sendo regulada positivamente em todos os períodos avaliados (Figura 5.5F).

Tabela 5.1 Amplificação dos genes nas DPSCs indiferenciadas

Gene	Paciente 12	Paciente 13	Paciente 30
MMP-1	-	-	+
MMP-2	+	+	+
MMP-3	-	+	+
MMP-7	+	+	+
MMP-9	-	+	-
MMP-10	-	+	-
MMP-11	-	-	-
MMP-12	+	+	-
MMP-13	+	+	+
MMP-14	+	-	+
MMP-15	+	+	+
MMP-16	-	-	-
MMP-17	-	-	+
MMP-25	+	+	+
MMP-28	-	-	+
TIMP-1	+	+	+
TIMP-2	+	+	+
TIMP-3	+	+	+
TIMP-4	+	+	+
RECK	+	+	+
Caveolina-1	+	+	+

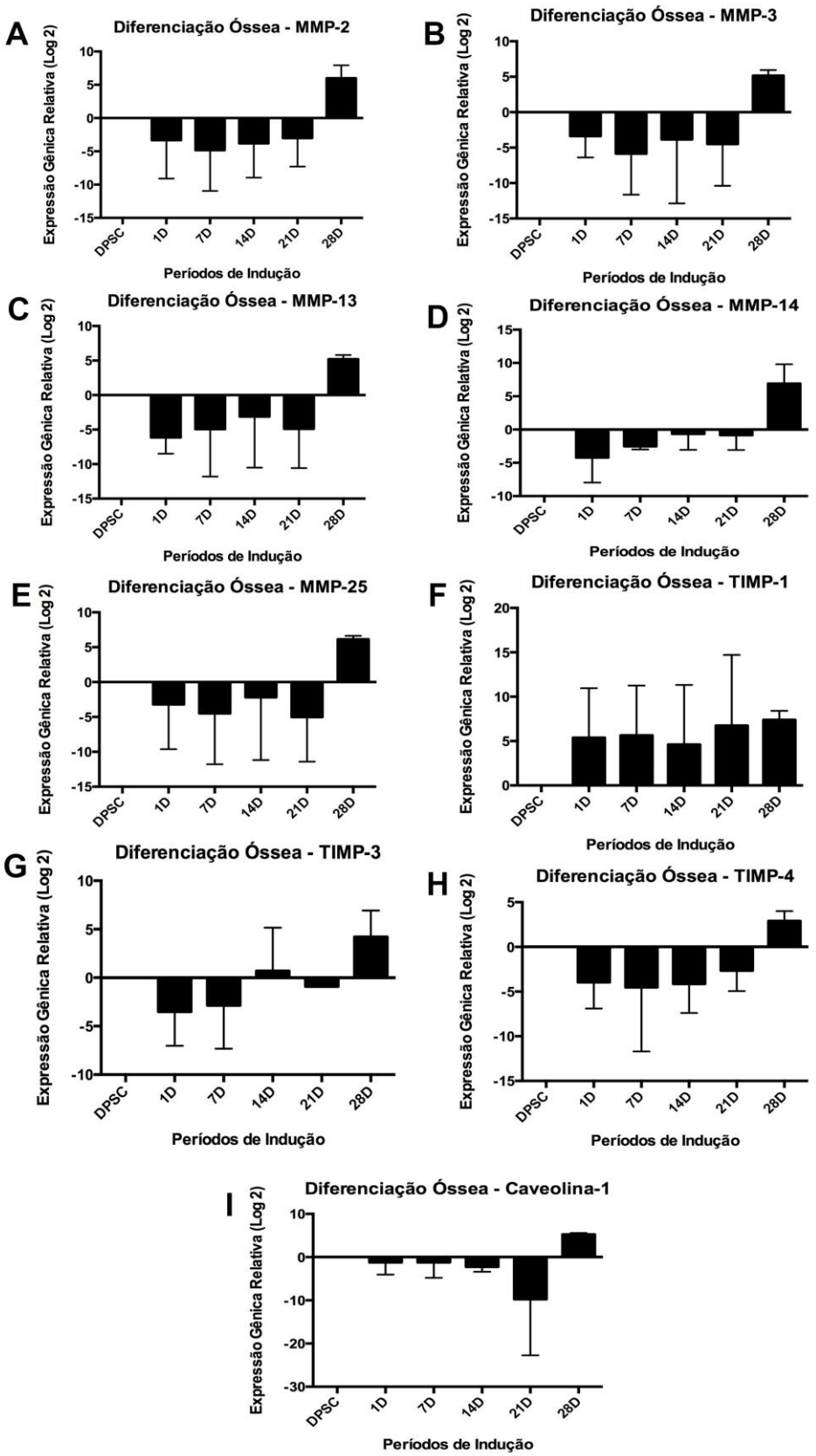


Figura 5.5 Expressão gênica diferencial detectada durante a indução da diferenciação óssea em DPSCs. Amostra calibradora: DPSC sem diferenciação. Gene endógeno: GAPDH.

6 DISCUSSÃO

Este trabalhou revelou a expressão diferencial de MMPs, seus inibidores e Caveolina-1 durante a indução da diferenciação óssea *in vitro* a partir de DPSCs, sendo o primeiro relato destas moléculas em DPSCs.

Poucos trabalhos avaliaram a presença e funcão das MMPs, TIMPs e RECK nas MSCs. Song e colaboradores (2006) relataram que MSCs secretam MMP-2 e não MMP-9. As MMP-14 (Son BR et al 2006) e MMP-2 (De Becker et al 2007) foram detectadas na migração destas células. RECK e MMP-14 foram identificados como importantes na migração de células-tronco hematopoiéticas (Golan et al 2011). A TIMP-3 regula a proliferação de HSC e parece ser importante para a manutenção do nicho destas células na medula óssea (Shen Y et al 2010; Nakajima H et al 2010).

É bastante conhecido que as MMPs e TIMPs são expressas por células da polpa dentária sadia: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-12 e TIMPs 1 a 4 (Sulkala et al 2004). Dentre elas, a MMP-13 é altamente expressa e considerada a collagenase mais importante do tecido pulpar (Palosaari et al. 2003, Sulkala et al. 2004). Suri e colaboradores (2008), utilizando células humanas da polpa dentária, demonstraram um aumento significativo dos níveis de MMP-13 que coincidia com o pico de atividade da fosfatase alcalina, desencadeando a mineralização. Além disso, estes autores sugerem que a MMP-13 pode ser uma marcador de diferenciação da transição destas células em células tipo-odontoblasto e tipo-osteoblasto (Tuckermann et al 2000). A MMP-13 também induz a expressão do receptor Toll-like-9 em MSCs (Nurmenniemi et al. 2010). No entanto, especificamente não se conhece o perfil de expressão das MMPs e TIMPs nas DPSCs.

Nós detectamos a expressão das MMP-2, MMP-7, MMP-13, MMP-15, MMP-25, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e RECK em todos os pacientes avaliados, as MMP-3, MMP-12 e MMP-14 em dois deles, as MMP-1, MMP-9, MMP-10, MMP-17 e MMP-28 em apenas um deles e as MMP-11 e MMP-16 não foram detectadas. Recentemente, trabalhos comparando o perfil de genes diferencialmente expressos por técnicas diferentes entre DPSCs e SHED identificaram que transcritos das MMP-1, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 foram mais expressos em SHED do que em DPSCs (Wang X et al 2012 – AOB) e a TIMP-1 bastante expressa em SHED (Abdullah et al

2013). Estes autores sugerem que estas podem estar envolvidas com eventos de proliferação e migração celular, mas a função destas enzimas e proteínas nas propriedades indiferenciadas das MSCs bem como das DPSCs ainda precisa ser elucida. Camundongos nocauteados para RECK ($RECK^{-/-}$ e $RECK^{+/-}$) morreram “in utero” por volta dos 10,5 dias do desenvolvimento embrionário (E10,5), ou seja, antes e comprometimento das MSCs com as linhagens mesenquimais. Além disso, estes animais apresentam a MEC alterada, tendo desarranjo na arquitetura tecidual o que acarreta anormal organogênese e redução significativa de colágeno tipo I, sugerindo que RECK pode ser um regulador chave da MEC através do controle da via de sinalização de Ras, a qual regula as MMPs e TIMPs (Noda et al., 2003). Não existem estudos sobre a função de RECK nas MSCs.

Desde a descoberta da MMP-13 em ossos longos de ratos (Walter et al., 1963), mais da metade dos membros da família das MMPs têm sido demonstrados no tecido ósseo em diversas espécies, tais como as colagenases - MMPs -1 (Cawston; Rowan, 1998) - gelatinases - MMPs -2 (Lefebvre et al., 1991) e -9 (Reponen et al., 1994) - estromelisinas - MMPs -3 (Keyszer et al., 1998) e -10 (Bord et al, 1998) - e MT1-MMP (MMP-14) (Holmbeck et al., 1999), sendo que as MMPs -9, -13 e -14 são as mais expressas. Além disso, a análise de camundongos *knockout* e modelos de doenças genéticas humanas têm chamado a atenção para a importância das MMPs -2, -9, -13 e -14 para o desenvolvimento ósseo (Delaissé et al., 2003). Desde a descoberta de que células ósseas secretavam inibidores de colagenases (Cawston et al., 1981) e, posteriormente, identificadas como sendo as TIMPs, estas foram identificadas em diversas células osteogênicas e condrogênicas. A TIMP mais expressa durante o desenvolvimento ósseo é a TIMP-2 (Apte et al., 1997; Blavier e DeClerck, 1997). Entretanto, as outras TIMPs também são expressas em elementos do esqueleto durante o desenvolvimento em humanos e camundongos (Flenniken e Williams, 1990; Meikle et al., 1991; Apte et al., 1994; Rifas et al., 1994; Hammani et al., 1996; Blavier e DeClerck, 1997; Zeng et al., 1998; Bord et al., 1999; Su et al., 1999; Huang et al., 2002; Shen Y et al 2010). Recentemente, a descrição de RECK e sua possível regulação da MEC em tecidos mineralizados tem sido demonstrada, tais como na amelogênese (Paiva et al., 2009a), ossificação intramembranosa e endocondral (Paiva KBS – dados não publicados) e na palatogênese (de Oliveira Demarchi et al., 2010).

Muitas anormalidades ósseas ou retardamento no desenvolvimento ósseo foram observadas em animais nocauteados para os genes da MMP-2 (Itoh et al 1997), MMP-9 (Vu et al 1998), MMP-13 (Inada M et al 2004; Stickens et al 2004), MMP-14 (Holmbeck et al 2004) e duplo nocaute das MMP-14/MMP-16 (Shi J et al 2008). Para os inibidores, os animais nocauteados para as TIMPs não apresentaram fenótipo ósseo anormal e os animais nocauteados para RECK morrem antes do início da osteogênese (Oh et al 2001). Assim, a chave para o entendimento do mecanismo molecular envolvido na remodelação da matriz óssea é a compreensão do balanço entre as MMPs e seus inibidores.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de potencial de diferenciação das MSCs. Dennis e colaboradores (1999) sugerem que, nas MSCs, existem alguns genes que podem ser expressos e ajustados as várias linhagens celulares sob diferentes condicões. Phinney e Prockop (2007) propõem que as MSCs são dotadas de proteínas motoras e um arsenal catalítico que são capazes de interagir e responder a sinais oriundos da MEC e, então, se diferenciarem em estruturas específicas, tais como músculo, osso, cartilage e outros tecidos conjuntivos.

As MSCs podem se diferenciar em adipócitos e em um progenitor osteo-condral. Este progenitor, quando expressa Sox5, 6 e 9, está comprometido com a diferenciação condrogênica e, quando expressa os fatores de transcrição Runx2 e Osterix, está coprometido com a diferenciação osteogênica. A maturação de uma MSC em um osteócito functional é um processo ordenado que consiste de, ao menos, cinco etapas: (I) MSC convertida a progenitor osteo-condral (que expressão Runx2 e colágeno 2 alfa); (II) comprometimento do progenitor osteo-condral (expressa Osterix); (III) expansão do osteoprogenitor e maturação dos osteoblastos (expressão osteocalcina e colágeno tipo I); e (IV) apoptose dos osteoblastos (Harada; Rodan, 2003; Rodda; McMahon, 2006). Estes marcadores estágio-específicos são utilizados para determiner o status da diferenciação osteogênica. A sinalização celular via Wnt tem sido, cada vez mais, demonstrada ser uma reguladora crucial da diferenciação osteogênica (Tuan, 2004). A inibição da via Wnt pode inibir a osteogênese e induzir MSCs a se manterem indiferenciadas (Gregory et al 2005)

A indução da diferenciação osteogênica clássica das MSCs humanas requer a incubação de células em monocamada com ácido ascórbico (vitamina C – induz a

síntese de colágeno tipo I), β-glicerofosfato (fonte de fosfato para a mineralização) e dexametasona (glicocorticóide sintético envolvido na indução da diferenciação osteoblástica), adicionados ao meio contendo soro fetal bovino, resultando no aumento da secreção de fosfatase alcalina e deposição de cálcio (Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999).

Alguns trabalhos mostraram que o ácido ascórbico em baixas concentrações estimula as MMPs e, em altas concentrações, as inibe (Philips N et al 2007). O ácido ascórbico aumenta a expressão das MMP-2 e MMP-13 em condrócitos bovinos (Ronziere et al 2003), RECK e TIMP-2 durante a indução da diferenciação osteoblástica da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3 (Zambuzzi et al 2009 – MCB), MMP-1 em células do ligamento periodontal (Shiga et al 2003). De forma contrária, a dexametasona diminui ou inibe a expressão de MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 em células do ligamento periodontal humano e isto está associado ao aumento da expressão de marcadores da diferenciação osteoblástica: Runx2, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I (Hakki et al 2009; Hayami et al 2007). A dexametasona suprime a expressão da TIMP-1 em células MC3T3 e esta associada a apoptose das células osteoblásticas, não estando associada a inibição das MMPs neste processo (Xie H et al 2010) e a também a supressão da TIMP-3 em condrócitos articulares humano e bovino (Su S et al 1996).

As MMP-1 e MMP-13 são conhecidas por serem secretadas por células osteogênicas (Partridge et al., 1996; Varghese; Canalis, 1997) e participarem na regulação da diferenciação osteoblástica. Um mecanismo clássico e importante que facilita a diferenciação osteoblástica envolve a secreção de colágeno (Andrianarivo et al., 1992; Franceschi and Iyer, 1992; Lynch et al., 1995; Mizuno et al., 2000). Os efeitos exercidos pelo colágeno e mediado via sinalização pelas integrinas (Globus et al., 1995; Jikko et al., 1999; Reyes and Garcia, 2004; Schneider et al., 2001; Xiao et al., 1998) ou pela apresentação apropriada de fatores estimulatórios as células (Aronow et al., 1990; Beck et al., 1998; Franceschi and Iyer, 1992; Franceschi et al., 1994; Torii et al., 1994). Diante deste mecanismo, é plausível que o aumento nos níveis das MMP-1 e MMP-13, principais colagenases, diminua ou retarde a diferenciação osteoblástica pela desregulação no acúmulo de matriz colagênica. A regulação da MMP-13 tem sido extensivamente estudada durante a diferenciação osteoblástica (D'Alonzo et al., 2002; Jimenez et al., 1999; Johansson et al., 1997;

Tuckermann et al., 2000; Winchester et al., 1999). Seu promotor contém sítios de ligação para Runx2 e é regulado por ele (Jimenez et al., 1999).

A verificação da participação das MMP-1 e MMP-13 na modulação da diferenciação osteoblástica foi confirmada através da verificação dos marcadores em células do ligamento periodontal que superexpressavam estas enzimas, sendo que houve uma significante redução dos níveis de transcritos de Runx2, osteonectina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea nas células MMP-1+ e apenas o fator de transcrição osterix (Osx) nas células MMP-13+ (Hayami T et al 2008 – MB).

A MMP-2 é expressa em MC3T3 (Thrailkili et al 1995), osteoblastos humanos (Meikle et al 1992; 1995; Rifas et al 1989; 1994) e cultura de osteoblastos de calvária de camundongos (Kusano K et al 1998). A MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1 e TIMP-2 também são conhecidas por modular a osteogênse in vitro e a MMP-14 é característica do fenótipo de osteblastos maduros em células de cultura primária de ratos (ROB) (Filanti et al 2000).

Recentemente, Barthelemi e colaboradores (2012) relataram que a diferenciação osteoblástica induzida por stress mecânico involve as MMP-2, MMP-13 e MMP-14.

Nossos resultados de que as MMP-2, MMP-3, MMP-13 e MMP-14, foram regulados negativamente do 1° ao 21° dia de indução da diferenciação e regulados positivamente apenas no 28° dia corrobora com o que tem sido relatado na literatura, com exceção da MMP-1 que nós não encontramos resultados consistentes. Já a MMP-25, TIMP-3 e TIMP-4, nada ou pouco se conhece neste processo de diferenciação *in vitro*. A MMP-25 foi detectada em pacientes com osteoartrite, sendo relacionada a remodelação óssea aberrante nesta patologia (Kumarasinghe et al 2010). A superexpressão da TIMP-3 na linhagem MC3T3 leva a não mineralização da matriz extracelular (Suzuki H et al 2003), sendo um resultado contrário ao nosso.

A função da Caveolina-1 em células-tronco parece estar associada tanto na manutenção de seu estado indiferenciado (“self-renewal”) quanto na proliferação e migração (Lee IH. et al. 2009; Park et al. 2009; Park et al. 2009;Lee SH. et al. 2010; Park et al. 2011). Lee e colaboradores (2010) demonstraram que Cav-1 é importante para a eficiência da manutenção do estado de indiferenciado e na regulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular de células-tronco embrionárias de camundongos (Lee MY.et al. 2010). Cav-1 é importante

na promoção de diferenciação de células-tronco neurais em células astrogliais devido a regulação da expressão de Notch e Hes1, proteínas importantes para proliferação e inibição da diferenciação de células-tronco neurais (Li Y. et al. 2011). Corroborando com a primeira hipótese, estudos demonstraram: (I) que a deficiência da Cav-1 aumenta a população de células-tronco na mama (Sotgia et al 2005); (II) causa hiperproliferação de células-tronco da cripta intestinal (Li J. et al. 2005); e (III) que células-tronco-mesenquimais originárias da medula óssea de ratos com deleção do gene da Cav-1 apresentaram retardamento na diferenciação adipogênica e osteogênica (Case et al. 2010). Por outro lado, o excesso de Cav-1 leva ao aceleramento da senescência celular (Park et al. 2005;Volonte et al. 2002). Estes trabalhos têm em comum a descrição da participação da Cav-1 nas vias de sinalização de Notch, integrinas, Wnt-catenina, MAPKs e Ras. Transcritos da Caveolina-1 foram regulados positivamente ao longo da indução da diferenciação osteogência em BMSCs e que a sua superexpressão nestas células aumenta a formação óssea (Baker et al 2012). Nossos resultados corroboram com estes resultados, parecendo ser parece o processo de regulacão da Caveolina-1 entre as BMSCs e DPSCs.

7 CONCLUSÃO

Assim, concluímos que as MMPs encontradas bem como as TIMP-3 e TIMP-4 podem estar participandodos eventos de diferenciação óssea em DPSCs e são também expressas no momento da remodelação da matriz extracelular para a formação óssea. A TIMP-1 pode estar participando de ambos os eventos biológicos e a MMP-11 não participa de nenhum deles.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho apresentado nesta dissertação de Mestrado é parte de um projeto mais amplo que está, ainda, em fase de execução (Anexo 2) que foi financiado pela FAPESP como bolsa de mestrado (processo n. 2011/04342-8 – vigência agosto/2011 a abril/2013, com relatório científico para abril/2014) e é vinculado ao Auxílio a Pesquisa modalidade Jovem Pesquisador FAPESP (processo n. 2010/08918-9 – vigência fevereiro/2011 a janeiro/2015) coordenado pela Profa. Katiucia.

No Doutorado, daremos continuidade ao trabalho aqui apresentado com o foco na diferenciação óssea visando a Bioengenharia de Tecidos utilizando ensaios funcionais de superexpressão e inibição gênica dos genes Caveolina-1, RECK e MMP-17 (Figura 8.1).

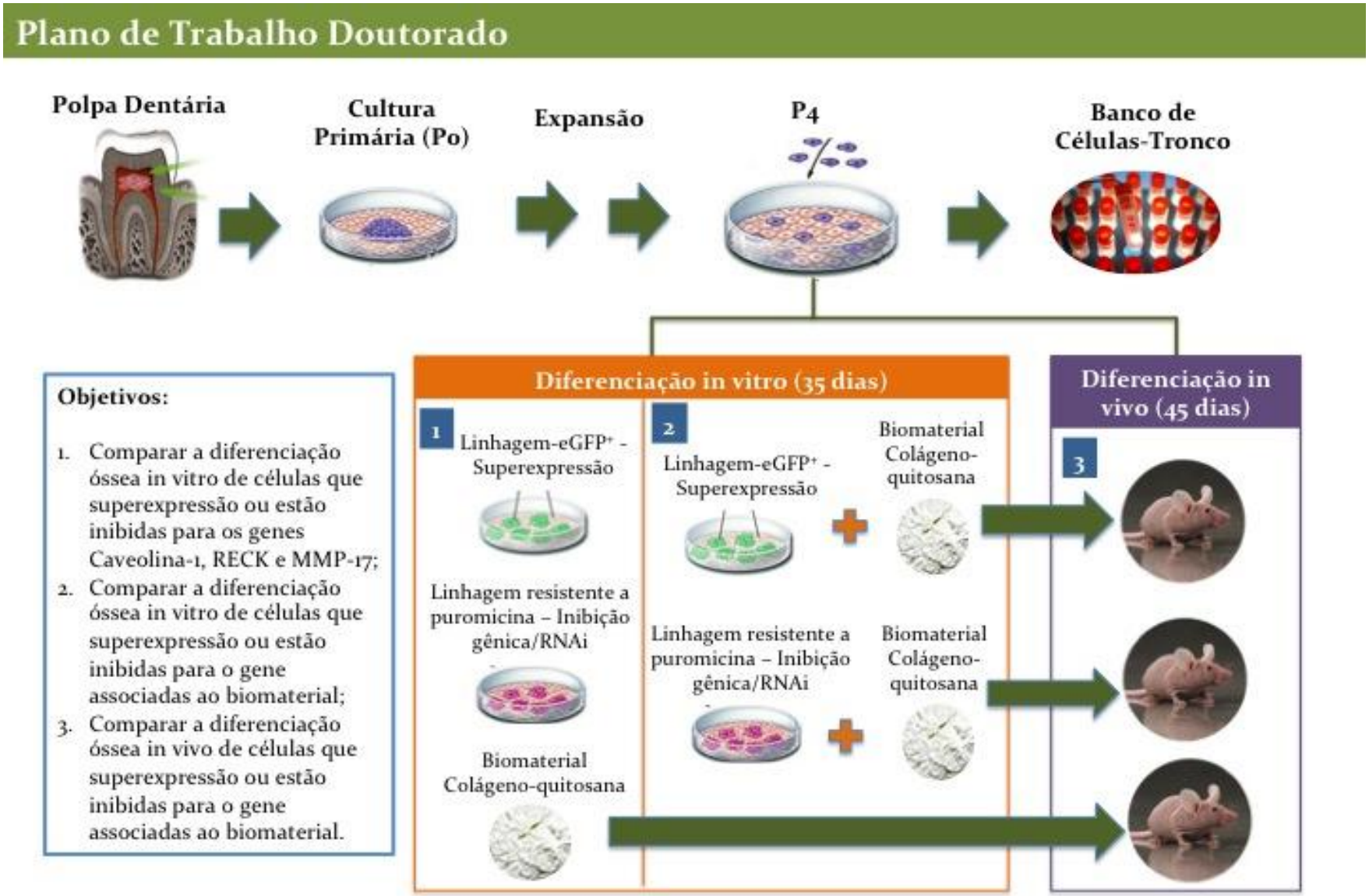


Figura 8.1 Plano de trabalho para ao projeto de doutorado.

REFERÊNCIAS[1]

Abdullah MF, Abdullah SF, Omar NS, Mahmood Z, Fazliah SN, Kannan TP, Mokhtar KI. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. Cell Biol Int. 2013 Dec 24.

Andrianarivo AG, Robinson JA, Mann KG, Tracy RP. Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma G-63 cells. J Cell Physiol. 1992 Nov;153(2):256-65.

Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. Trends Mol Med. 2010 May;16(5):203-9.

Apte SS, Fukai N, Beier DR, Olsen BR. The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. J Biol Chem 1997 Oct 10;272(41):25511-7.

Arbelaéz LF, Stigbrand T. Purification of pregnancy zone protein and its receptor binding domain from human plasma. Protein Expr Purif. 1997 Aug;10(3):301-8.

Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. J Cell Physiol. 1990 May;143(2):213-21.

Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. J Clin Pediatr Dent. 2009 Summer;33(4):289-94.

Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, Jung HS, Alfaro FH, Casals N, Prosper F, Ferrés-Padró E, Giner L. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. J Cell Sci. 2012 Jul 15;125(Pt 14):3343-56.

Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. Eur Cell Mater. 2010 Sep 1;20:121-33.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Baker JF, Davis M, Alexander R, Zemel BS, Mostoufi-Moab S, Shults J, Sulik M, Schiferl DJ, Leonard MB. Associations between body composition and bone density and structure in men and women across the adult age spectrum. Bone. 2013 Mar;53(1):34-41.

Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007 Jun;25(6):1384-92.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility,cell migration, and body distribution. Circulation. 2003 Aug 19;108(7):863-8.

Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. Arthritis Rheum. 2003 May;48(5):1315-25.

Barthelemi S, Robinet J, Garnotel R, Antonicelli F, Schittly E, Hornebeck W,Lorimier S. Mechanical forces-induced human osteoblasts differentiation involves MMP-2/MMP-13/MT1-MMP proteolytic cascade. J Cell Biochem. 2012 Mar;113(3):760-72.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. J Dent Res. 2003 Dec;82(12):976-81.

Bauer HJ, ter Muelen V, Koprowski H, Argyrakis A, Orthner H. Early sterile autopsy in etiological studies on multiple sclerosis. J Neurol. 1975;208(3):159-74.

Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression.Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1825(1):29-36.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.Cell. 2003 Sep 19;114(6):763-76.

Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? Matrix Biol. 1997 Mar;15(8-9):519-26.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells:nature, biology, and potential applications. Stem Cells. 2001;19(3):180-92.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history,concepts, and assays. Cell Stem Cell. 2008 Apr 10;2(4):313-9.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol. 1993 May;64(5 Suppl):474-84.

Blavier L, DeClerck YA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is expressed in the interstitial matrix in adult mouse organs and during embryonic development. Mol Biol Cell 1997 Aug;8(8):1513-27

Bord S, Horner A, Beeton CA, Hembry RM, Compston JE. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. Bone 1999 Mar;24(3):229-35.

Boyan BD, Wang L, Wong KL, Jo H, Schwartz Z. Plasma membrane requirements for 1alpha,25(OH)2D3 dependent PKC signaling in chondrocytes and osteoblasts. Steroids. 2006 Apr;71(4):286-90.

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta. 2010 Jan;1803(1):55-71.

Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. Clin Orthop Relat Res. 1992 Feb;(275):287-99.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Mar;3(3):207-14.

Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. Cancer Res. 1990 Oct 1;50(19):6184-91.

Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. Biochemistry. 2009 Nov 24;48(46):10830-45.

Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, Bonatto D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. Stem Cells Dev. 2013 May 1;22(9):1455-76.

Calloni R, Viegas GS, Türck P, Bonatto D, Pegas Henriques JA. Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. Cytotherapy. 2014 Jan;16(1):3-16.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.

Cao G, Yang G, Timme TL, Saika T, Truong LD, Satoh T, Goltsov A, Park SH, Men T, Kusaka N, Tian W, Ren C, Wang H, Kadmon D, Cai WW, Chinault AC, Boone TB,Bradley A, Thompson TC. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. Am J Pathol. 2003 Apr;162(4):1241-8.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep;9(5):641-50.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. Odontology. 2011 Jan;99(1):1-7.

Case N, Xie Z, Sen B, Styner M, Zou M, O'Conor C, Horowitz M, Rubin J. Mechanical activation of β-catenin regulates phenotype in adult murine marrow-derived mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 2010 Nov;28(11):1531-8.

Caterina JJ, Yamada S, Caterina NC, Longenecker G, Holmbäck K, Shi J, Yermovsky AE, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. J Biol Chem. 2000 Aug 25;275(34):26416-22.

Cawston TE, Curry VA, Summers CA, Clark IM, Riley GP, Life PF, Spaull JR,Goldring MB, Koshy PJ, Rowan AD, Shingleton WD. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. Arthritis Rheum. 1998 Oct;41(10):1760-71.

Cawston TE, Murphy G. Mammalian collagenases. Methods Enzymol. 1981;80 Pt C:711-22.

Chen YG. Endocytic regulation of TGF-beta signaling. Cell Res. 2009 Jan;19(1):58-70. doi: 10.1038/cr.2008.315.

Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. Physiol Rev. 2004 Oct;84(4):1341-79.

Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, Lisanti MP.Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Jul;285(1):C222-35.

Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. J Exp Med. 1993 May 1;177(5):1331-42.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B,Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S,Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell. 2008 Sep 11;3(3):301-13.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol. 1999 Nov;189(3):300-8.

D'Alonzo RC, Kowalski AJ, Denhardt DT, Nickols GA, Partridge NC. Regulation of collagenase-3 and osteocalcin gene expression by collagen and osteopontin in differentiating MC3T3-E1 cells. J Biol Chem. 2002 Jul 5;277(27):24788-98.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008 Sep;26(9):2287-99.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.

De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet I. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Haematologica. 2007 Apr;92(4):440-9.

de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, Cerruti H, Alonso N, Passos-Bueno MR. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. J Craniofac Surg. 2008 Jan;19(1):204-10.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum. 2001 Aug;44(8):1928-42.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. J Cell Biol. 2003 Mar 17;160(6):909-18.

De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. Arthritis Rheum. 2006 Apr;54(4):1209-21.

de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela MG, Nunes FD, de Cassia Savio FR, et al. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. Cell Tissue Res 2010 Apr;340(1):61-9.

Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. Exp Cell Res. 2003 Jul 1;287(1):16-27.

Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc Res Tech. 2003 Aug 15;61(6):504-13.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. J Bone Miner Res. 1999 May;14(5):700-9.

Dezawa M. Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases. Med Mol Morphol. 2008 Mar;41(1):14-9.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin Orthop Relat Res. 1992 Feb;(275):280-6.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin Orthop Relat Res. 1992 Feb;(275):280-6.

Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. Histol Histopathol. 1991 Apr;6(2):269-86.

Dissanayaka WL, Zhan X, Zhang C, Hargreaves KM, Jin L, Tong EH. Coculture of dental pulp stem cells with endothelial cells enhances osteo-/odontogenic and angiogenic potential in vitro. J Endod. 2012 Apr;38(4):454-63.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D,Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.

Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. J Cell Sci. 2004 Feb 29;117(Pt6):889-97.

Durbeej M, Ekblom P. Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. Exp Lung Res. 1997 Mar-Apr;23(2):109-18.

Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. J Histochem Cytochem. 2001 Apr;49(4):419-32.

Echarri A, Muriel O, Pavón DM, Azegrouz H, Escolar F, Terrón MC, Sanchez-Cabo F, Martínez F, Montoya MC, Llorca O, Del Pozo MA. Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. J Cell Sci. 2012 Jul 1;125(Pt 13):3097-113.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar;2(3):161-74.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. J Prosthodont Res. 2012 Jul;56(3):151-65.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):235-42.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

Fan CG, Tang FW, Zhang QJ, Lu SH, Liu HY, Zhao ZM, Liu B, Han ZB, Han ZC. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2005;14(5):311-21.

Fang PK, Solomon KR, Zhuang L, Qi M, McKee M, Freeman MR, Yelick PC. Caveolin-1alpha and -1beta perform nonredundant roles in early vertebrate development. Am J Pathol. 2006 Dec;169(6):2209-22.

Fata JE, Werb Z, Bissell MJ. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. Breast Cancer Res. 2004;6(1):1-11. Epub 2003 Aug 19.

Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro,the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. J Bone Miner Res. 2000 Nov;15(11):2154-68.

Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. Arch Dermatol Res. 1998 Jul;290 Suppl:S12-23.

Flenniken AM, Williams BR. Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. Genes Dev 1990 Jul;4(7):1094-106.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8655-9.

Franceschi RT, Iyer BS, Cui Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. J Bone iner Res. 1994 Jun;9(6):843-54.

Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res. 1992 Feb;7(2):235-46.

Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res. 1992 Feb;7(2):235-46.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970 Oct;3(4):393-403.

Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. J Cell Sci. 2000 Oct;113 Pt 19:3509-17.

Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function,induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. Stem Cells. 2008 Mar;26(3):638-45.

Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. Mol Cell Endocrinol. 2008 Jun 25;288(1-2):22-9.

Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J. 2011 Jan;278(1):16-27.

Globus RK, Moursi A, Zimmerman D, Lull J, Damsky C. Integrin-extracellular matrix interactions in connective tissue remodeling and osteoblast differentiation. ASGSB Bull. 1995 Oct;8(2):19-28.
Gojo S, Umezawa A. Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts. Hum Cell. 2003 Mar;16(1):23-30.

Golan K, Vagima Y, Goichberg P, Gur-Cohen S, Lapidot T. MT1-MMP and RECK: opposite and essential roles in hematopoietic stem and progenitor cell retention and migration. J Mol Med (Berl). 2011 Dec;89(12):1167-74

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 Jan 1;15(1):13-27.

Gomis-Rüth FX, Gómez-Ortiz M, Vendrell J, Ventura S, Bode W, Huber R, Avilés FX. Crystal structure of an oligomer of proteolytic zymogens: detailed conformational analysis of the bovine ternary complex and implications for their activation. J Mol Biol. 1997 Jun 27;269(5):861-80

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Rev. 2008 Spring;4(1):21-6.

Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow.Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1049:97-106.

Gronthos S. The therapeutic potential of dental pulp cells: more than pulp fiction? Cytotherapy. 2011 Nov;13(10):1162-3.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002 Aug;81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahim 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 Dec 5;97(25):13625-30.

GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 1962 Jun 15;48:1014-22.

Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. FEBS J. 2011 Jan;278(1):28-45.
Haines P, Samuel GH, Cohen H, Trojanowska M, Bujor AM. Caveolin-1 is a negative regulator of MMP-1 gene expression in human dermal fibroblasts via inhibition of Erk1/2/Ets1 signaling pathway. J Dermatol Sci. 2011 Dec;64(3):210-6.

Hakki SS, Hakki EE, Nohutcu RM. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2009 Dec;44(6):794-802.

Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriet P, DeClerck YA. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. J Biol Chem. 1996 Oct 11;271(41):25498-505.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature. 2003 May 15;423(6937):349-55.

Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? J Endod. 2008 Jul;34(7 Suppl):S51-6.

Harper E, Bloch KJ, Gross J. The zymogen of tadpole collagenase. Biochemistry. 1971 Aug 3;10(16):3035-41.

Hathaway HJ, Shur BD. Mammary gland morphogenesis is inhibited in transgenic mice that overexpress cell surface beta1,4-galactosyltransferase. Development.1996 Sep;122(9):2859-72.

Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. Matrix Biol. 2008 Oct;27(8):682-92.

Hayashi H, Shimizu R, Fujii K, Itoh S, Yang D, Onozaki K. Resistance to IL-1 anti-proliferative effect, accompanied by characteristics of advanced melanoma,permits invasion of human melanoma cells in vitro, but not metastasis in the nude mouse. Int J Cancer. 1997 May 2;71(3):416-21.

Hayami T, Zhang Q, Kapila Y, Kapila S. Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression. Bone. 2007 Jan;40(1):93-104.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone.1992;13(1):69-80.

Head BP, Peart JN, Panneerselvam M, Yokoyama T, Pearn ML, Niesman IR, Bonds JA, Schilling JM, Miyanohara A, Headrick J, Ali SS, Roth DM, Patel PM, Patel HH.Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. PLoS One. 2010 Dec 23;5(12):e15697.

Henkemeyer M, Rossi DJ, Holmyard DP, Puri MC, Mbamalu G, Harpal K, Shih TS,Jacks T, Pawson T. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. Nature. 1995 Oct 26;377(6551):695-701..

Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W.Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. J Cell Physiol. 2007 Jun;211(3):682-91.

Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U.Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. J Clin Invest. 2001 May;107(9):1117-26.

Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K,Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S,Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem Cells. 2008 Jul;26(7):1695-704.

Hnasko R, Lisanti MP. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. Mol Interv. 2003 Dec;3(8):445-64.

Hollins AJ, Campbell L, Gumbleton M, Evans DJ. Caveolin expression during chondrogenesis in the avian limb. Dev Dyn. 2002 Oct;225(2):205-11.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. Cell. 1999 Oct 1;99(1):81-92.

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billinghurst RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. J Cell Sci. 2005 Jan 1;118(Pt 1):147-56.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC,Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy.Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005;7(5):393-5.

Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. J Oral Pathol Med. 2008 Oct;37(9):571-4.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009 Sep;88(9):792-806.

Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. J Endod. 2006 Nov;32(11):1066-73.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. Cell Tissue Res. 2006 May;324(2):225-36.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. 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 Feb;16(2):605-15.

Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Tissue inhibitor of etalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. J Cell Biochem 2002;85(2):295-303.

Hubmacher D, Apte SS. The biology of the extracellular matrix: novel insights.Curr Opin Rheumatol. 2013 Jan;25(1):65-70.

Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otín C, Krane SM.Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 7;101(49):17192-7.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH,Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood. 2003 Aug 15;102(4):1548-9.

Inokuchi J. Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. Biol Pharm Bull. 2006 Aug;29(8):1532-7.

Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H,Sugiyama M, Kamata N, Iwata T, Matsubara T, Nakamura K, Kurihara H, Tsuji K, Kato Y. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jun 24;332(1):297-303.

Itoh M, Osaki M, Chiba T, Masuda K, Akizawa T, Yoshioka M, Seiki M. Flow injection analysis for measurement of activity of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). J Pharm Biomed Anal. 1997 Jun;15(9-10):1417-26.

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med. 2000 Feb;6(2):88-95.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. Science. 2002 Oct 18;298(5593):601-4.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem.1997 Feb;64(2):295-312.

Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. J Cell Mol Med. 2005 Jan-Mar;9(1):37-50.

Jazedje T, Perin PM, Czeresnia CE, Maluf M, Halpern S, Secco M, Bueno DF,Vieira NM, Zucconi E, Zatz M. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. J Transl Med. 2009 Jun 18;7:46.

Jikko A, Harris SE, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1075-83.

Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, Choi AM. Caveolin-1: a critical regulator of lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011 Feb;300(2):L151-60.

Jiménez MJ, Balbín M, López JM, Alvarez J, Komori T, López-Otín C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. Mol Cell Biol. 1999 Jun;19(6):4431-42.

Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):11-21.

Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology (Oxford). 2008 Feb;47(2):126-31.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D.Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. Arthritis Rheum. 2004 Mar;50(3):817-27.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum. 2002 Dec;46(12):3349-60.

Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, Jung K.Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. Z Rheumatol. 1998 Dec;57(6):392-8.

Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM,Maranduba CM, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA, Miglino MA, Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? J Transl Med. 2008 Jul 3;6:35.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM,Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs. 2006;184(3-4):105-16.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006 May;24(5):1294-301.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell. 2010 Apr 2;141(1):52-67.
Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. Science. 1998 May 8;280(5365):898-902.

Kitagawa M, Ueda H, Iizuka S, Sakamoto K, Oka H, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Tahara H, Takata T. Immortalization and characterization of human dental pulp cells with odontoblastic differentiation. Arch Oral Biol. 2007 Aug;52(8):727-31. Epub 2007 Mar 12.

Kmiecik G, Niklińska W, Kuć P, Pancewicz-Wojtkiewicz J, Fil D, Karwowska A,Karczewski J, Mackiewicz Z. Fetal membranes as a source of stem cells. Adv Med Sci. 2013 Dec 10:1-11.

Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. J Dent Educ. 2002 Jun;66(6):766-73.
Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. J Cell Physiol. 2010 Feb;222(2):268-77.

Kumarasinghe DD, Perilli E, Tsangari H, Truong L, Kuliwaba JS, Hopwood B,Atkins GJ, Fazzalari NL. Critical molecular regulators, histomorphometric indices and their correlations in the trabecular bone in primary hip osteoarthritis.Osteoarthritis Cartilage. 2010 Oct;18(10):1337-44.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. J Cell Biol. 1992 Sep;118(5):1003-14.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T.Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. Endocrinology. 1998 Mar;139(3):1338-45.

Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. FASEB J. 2004 Apr;18(6):690-2.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F,Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. J Craniofac Surg. 2006 May;17(3):511-5.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G,Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). J Bone Miner Res. 2005 Aug;20(8):1394-402.

Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. J Cell Biol. 2009 May 4;185(3):381-5.

Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E. The stem cells of the neural crest. Cell Cycle. 2008 Apr 15;7(8):1013-9.

Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E. Neural crest cell plasticity and its limits. Development. 2004 Oct;131(19):4637-50.

Le Douarin NM, Dupin E. Multipotentiality of the neural crest. Curr Opin Genet Dev. 2003 Oct;13(5):529-36.

Lee IH, Campbell CR, Song SH, Day ML, Kumar S, Cook DI, Dinudom A. The activity of the epithelial sodium channels is regulated by caveolin-1 via a Nedd4-2-dependent mechanism. J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):12663-9.

Lee MY, Ryu JM, Lee SH, Park JH, Han HJ. Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal. J Lipid Res. 2010 Aug;51(8):2082-9.

Lee SH, Lee YJ, Park SW, Kim HS, Han HJ. Caveolin-1 and integrin β1 regulate embryonic stem cell proliferation via p38 MAPK and FAK in high glucose. J Cell Physiol. 2011 Jul;226(7):1850-9.

Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. Biochim Biophys Acta. 1991 Aug 13;1094(1):8-18.

Li J, Hassan GS, Williams TM, Minetti C, Pestell RG, Tanowitz HB, Frank PG,Sotgia F, Lisanti MP. Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. Cell Cycle. 2005 Dec;4(12):1817-25.

Li Y, Lau WM, So KF, Tong Y, Shen J. Caveolin-1 promote astroglial differentiation of neural stem/progenitor cells through modulating Notch1/NICD and Hes1 expressions. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Apr 15;407(3):517-24.

Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Oral Dis. 2014 Jan;20(1):25-34.

Lightner VA, Erickson HP. Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. J Cell Sci. 1990 Feb;95 (Pt 2):263-77.

Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, Khaw PT. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. Am J Pathol. 2005 May;166(5):1555-63.
Lofthouse RA, Davis JR, Frondoza CG, Jinnah RH, Hungerford DS, Hare JM. Identification of caveolae and detection of caveolin in normal human osteoblasts.J Bone Joint Surg Br. 2001 Jan;83(1):124-9.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. Exp Cell Res. 1995 Jan;216(1):35-45.

Löhler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. Cell. 1984 Sep;38(2):597-607.

López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. Cell Cycle. 2009 Nov 15;8(22):3657-62.

Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 2002 Jul 12;277(28):25527-36.

Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. Biochim Biophys Acta. 2013 Nov;1834(11):2380-4.

Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosci. 2006 May 1;11:1696-701.

Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. Apoptosis. 2005 Jan;10(1):19-24.

Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix etalloproteinases. Prog Histochem Cytochem. 2012 Mar;47(1):27-58.

Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 Mar;24(3):475-81.

Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Apr;72(4):1441-5.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. Science. 1971 Jan 22;171(3968):293-4.

McGonagle D, Jones E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. Rheumatology (Oxford). 2008 Aug;47(8):1114-6.

Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. Biomaterials. 2008 Jul;29(21):3053-61.

Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. J Cell Sci. 1992 Dec;103.

Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Reynolds JJ. The synthesis of collagenase,gelatinase-A (72 kDa) and -B (95 kDa), and TIMP-1 and -2 by human osteoblasts from normal and arthritic bone. Bone. 1995 Sep;17(3):255-60.

Meikle MC, McGarrity AM, Thomson BM, Reynolds JJ. Bone-derived growth factors modulate collagenase and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) activity and type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts. Bone Miner 1991 Jan;12(1):41-55.

Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2006 Sep;30(9):681-7.

Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C. Stem cell niches in mammals. Exp Cell Res. 2007 Oct 1;313(16):3377-85.

Mitsiadis TA, Papagerakis P. Regenerated teeth: the future of tooth replacement? Regen Med. 2011 Mar;6(2):135-9.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M. A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. Nature. 1993 Apr 29;362(6423):839-41.

Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. J Cell Physiol. 2000 Aug;184(2):207-13.

Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S,Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. J Exp Med. 2009 Oct 26;206(11):2483-96.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature. 2006 Jun 29;441(7097):1068-74.

Morsczeck C, Langendörfer D, Schierholz JM. A quantitative real-time PCR assay for the detection of tetR of Tn10 in Escherichia coli using SYBR Green and the Opticon. J Biochem Biophys Methods. 2004 Jun 30;59(3):217-27.

Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, Banda MJ. Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. J Biol Chem. 2000 Jan 14;275(2):1384-90.

Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Oct 24;92(22):10339-43.

Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P,Basset P. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. J Biol Chem. 1993 Jul 25;268(21):15435-41.

Muschler J, Levy D, Boudreau R, Henry M, Campbell K, Bissell MJ. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. Cancer Res. 2002 Dec 1;62(23):7102-9.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. Pathol Int. 2002 Apr;52(4):255-64.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.

Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. Biochemistry. 1990 Jun 19;29(24):5783-9.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006 Feb 15;69(3):562-73.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. J Orthop Res. 1991 Jul;9(4):465-76.

Nakajima H, Ito M, Smookler DS, Shibata F, Fukuchi Y, Morikawa Y, Ikeda Y,Arai F, Suda T, Khokha R, Kitamura T. TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. Blood.2010 Nov 25;116(22):4474-82.

Nayar B, Raju GM, Deka D. Hematopoietic stem/progenitor cell harvesting from umbilical cord blood. Int J Gynaecol Obstet. 2002 Oct;79(1):31-2.

Nethe M, Hordijk PL. A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. Cell Adh Migr. 2011 Jan-Feb;5(1):59-64.

Netzer KO, Suzuki K, Itoh Y, Hudson BG, Khalifah RG. Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. Protein Sci. 1998 Jun;7(6):1340-51.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. Cancer Metastasis Rev. 2003 Jun-Sep;22(2-3):167-75.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res. 2002 Sep;20(5):1060-9.

Nurmenniemi S, Kuvaja P, Lehtonen S, Tiuraniemi S, Alahuhta I, Mattila RK,Risteli J, Salo T, Selander KS, Nyberg P, Lehenkari P. Toll-like receptor 9 ligands enhance mesenchymal stem cell invasion and expression of matrix metalloprotease-13. Exp Cell Res. 2010 Oct 1;316(16):2676-82.

O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, Vercauteren S, Nagy A, Eaves CJ. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells. 2008 May;26(5):1109-16.

Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, Kubo Y, Hattori K, Saito S, Horimoto K, Yuba S, Ohgushi H. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. J Biol Chem. 2010 Sep 17;285(38):29270-8.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S,Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H,Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell. 2001 Dec 14;107(6):789-800.

Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. J Biol Chem. 2009 Feb 6;284(6):3461-9.

Palade GE. Fine structure of bloodie capillaries. *J Appl Phys*, 1953 Jul, 1424-36
Papaccio G, Laino G. First International Meeting on "Stem Cell Applications in the Craniofacial Region". J Cell Physiol. 2006 Sep;208(3):473-5.

Park JH, Han HJ. Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Oct;297(4):C935-44.

Park JH, Lee MY, Han HJ. A potential role for caveolin-1 in estradiol-17beta-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Src, PI3K/Akt, and MAPKs pathways. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Mar;41(3):659-65.
Park JH, Ryu JM, Han HJ. Involvement of caveolin-1 in fibronectin-induced mouse embryonic stem cell proliferation: role of FAK, RhoA, PI3K/Akt, and ERK ½ pathways. J Cell Physiol. 2011 Jan;226(1):267-75.

Park JS, Kim HY, Kim HW, Chae GN, Oh HT, Park JY, Shim H, Seo M, Shin EY, Kim EG, Park SC, Kwak SJ. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. Mech Ageing Dev. 2005 May;126(5):551-9. Epub 2005 Jan 18.

Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. J Cell Sci. 2006 Mar 1;119(Pt 5):787-96.

Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, Orrico C,Lanzoni G, Buzzi M, Luigi Tazzari P, Pagliaro P, Stella A, Paolo Bagnara G.Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics. Cytotherapy. 2010 May;12(3):275-87.

Partridge NC, Walling HW, Bloch SR, Omura TH, Chan PT, Pearman AT, Chou WY.The regulation and regulatory role of collagenase in bone. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1996;6(1):15-27.

Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature. 1995 May 18;375(6528):244-7.

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol. 2001 May;3(5):473-83.

Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. Int J Oral Sci. 2009 Mar;1(1):6-12.

Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. Trends Genet. 1999 Feb;15(2):59-65.

Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. Birth Defects Res C Embryo Today. 2010 Mar;90(1):67-74.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G,Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M,Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation. 2005 Sep 27;80(6):836-42.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA,Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Philips N, Keller T, Holmes C. Reciprocal effects of ascorbate on cancer cell growth and the expression of matrix metalloproteinases and transforming rowth factor-beta. Cancer Lett. 2007 Oct 18;256(1):49-55.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells. 2007 Nov;25(11):2896-902.

Pol A, Martin S, Fernández MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. Mol Biol Cell. 2005 Apr;16(4):2091-105.

Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. Stem Cells. 2008 Sep;26(9):2201-10.

Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1553-61.

Reyes CD, García AJ. Alpha2beta1 integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. J Biomed Mater Res A. 2004 Jun 15;69(4):591-600. PubMed PMID: 15162400.

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Rev. 2009 Dec;5(4):378-86.

Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV, Welgus HG. Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. Endocrinology. 1994 Jan;134(1):213-21.

Rifas L, Halstead LR, Peck WA, Avioli LV, Welgus HG. Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. J Clin Invest. 1989 Aug;84(2):686-94.

Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors.Development. 2006 Aug;133(16):3231-44.

Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. Biochim Biophys Acta. 2010 Jan;1803(1):39-54.

Rohrbach DH, Robinson LK, Murrah VA. Loss of the basement membrane matrix molecule, bamin, in diphenylamine-treated mice. Matrix. 1993 Sep;13(5):341-50.

Romeo F, Costanzo F, Agostini M. Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin? Aging (Albany NY). 2012 Dec;4(12):878-86.

Ronzière MC, Roche S, Gouttenoire J, Démarteau O, Herbage D, Freyria AM.Ascorbate modulation of bovine chondrocyte growth, matrix protein gene expression and synthesis in three-dimensional collagen sponges. Biomaterials. 2003 Feb;24(5):851-61.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG.Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell. 1992 Feb21;68(4):673-82.

Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA,Antsaklis A, Anagnou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2007 Dec;16(6):931-52.

Rubin J, Schwartz Z, Boyan BD, Fan X, Case N, Sen B, Drab M, Smith D, Aleman M, Wong KL, Yao H, Jo H, Gross TS. Caveolin-1 knockout mice have increased bone size and stiffness. J Bone Miner Res. 2007 Sep;22(9):1408-18.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005 Feb;23(2):220-9.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM,Noda M, Sogayar MC. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. Cancer Detect Prev. 2002;26(6):435-43.

Sasahara RM, Takahashi C, Noda M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Nov 2;264(3):668-75.

Sasahara RM, Takahashi C, Sogayar MC, Noda M. Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. Braz J Med Biol Res. 1999 Jul;32(7):891-5.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. J Immunol. 2008 Feb 15;180(4):2581-7.

Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. FEBS Lett. 1996 Sep 9;393(1):101-4.

Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. Blood. 2005 Jul 15;106(2):756-63.

Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. J Cell Biol. 1989 Apr;108(4):1547-56.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. J Clin Invest. 2005 Aug;115(8):2223-33.

Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. J Biol Chem. 1995 Jul 7;270(27):16395-401.

Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. J Dent Res. 2001 Jun;80(6):1540-4.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells. 1978;4(1-2):7-25.

Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. Development. 2004 Dec;131(23):5883-95.

Schwab W, Galbiati F, Volonte D, Hempel U, Wenzel KW, Funk RH, Lisanti MP,Kasper M. Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1,-2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. Histochem Cell Biol. 1999 Jul;112(1):41-9.

Schwab W, Gavlik JM, Beichler T, Funk RH, Albrecht S, Magdolen V, Luther T,Kasper M, Shakibaei M. Expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor in human articular chondrocytes: association with caveolin and beta 1-integrin. Histochem Cell Biol. 2001 Apr;115(4):317-23.

Schwab W, Harada H, Goetz W, Nowicki M, Witt M, Kasper M, Barth K. Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ: differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells. Histochem Cell Biol. 2007 Sep;128(3):195-203.

Schwab W, Hempel U, Funk RH, Kasper M. Ultrastructural identification of caveolae and immunocytochemical as well as biochemical detection of caveolin inchondrocytes. Histochem J. 1999 May;31(5):315-20.

Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. Curr Opin Cell Biol. 2002 Oct;14(5):624-32.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. Biomed Mater. 2010 Dec;5(6):062001.

Shen Y, Winkler IG, Barbier V, Sims NA, Hendy J, Lévesque JP. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo. PLoS One. 2010 Sep 30;5(9). pii: e13086.

Shi J, Son MY, Yamada S, Szabova L, Kahan S, Chrysovergis K, Wolf L, Surmak A,Holmbeck K. Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. Dev Biol. 2008 Jan 1;313(1):196-209. Epub 2007 Oct 23.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res. 2005 Aug;8(3):191-9.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003 Apr;18(4):696-704.

Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. Bone. 2001 Dec;29(6):532-9.

Si Z, Wu J, He Z, Li T. [Effect of interleukin-17 and T helper cell 17 on acute heart allograft rejection in mice]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011 Jul;36(7):676-81.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Oct;1(1):31-9. Review. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol 2001 Mar;2(3):216.

Solomon KR, Adolphson LD, Wank DA, McHugh KP, Hauschka PV. Caveolae in human and murine osteoblasts. J Bone Miner Res. 2000 Dec;15(12):2391-401.

Solomon KR, Danciu TE, Adolphson LD, Hecht LE, Hauschka PV. Caveolin-enriched membrane signaling complexes in human and murine osteoblasts. J Bone Miner Res.2000 Dec;15(12):2380-90.

Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J,Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases.Stem Cells. 2006 ay;24(5):1254-64.

Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. J Biol Chem. 1996 Jun 21;271(25):15160-5.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One. 2006 Dec 20;1:e79.

Sotgia F, Williams TM, Cohen AW, Minetti C, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1-deficient mice have an increased mammary stem cell population with upregulation of Wnt/beta-catenin signaling. Cell Cycle. 2005 Dec;4(12):1808-16.

Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H. Localization of cleavage sites for human fibroblast collagenase in the bait region of five mammalian alpha-macroglobulins. Matrix Suppl. 1992;1:263-8.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(1):364-8.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Abberton K, Messer HH, Thompson EW.Revascularization and tissue regeneration of an empty root canal space is enhanced by a direct blood supply and stem cells. Dent Traumatol. 2013 Apr;29(2):84-91.

Stahlhut M, van Deurs B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. Mol Biol Cell. 2000 Jan;11(1):325-37.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell. 1999 Jul 23;98(2):137-46.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. Sci Signal. 2008 Jul 8;1(27):re6.

Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins,adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Sci. 1995 May;4(5):823-40.

Su S, Dehnade F, Zafarullah M. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by transforming growth factor-beta and dexamethasone in bovine and human articular chondrocytes. DNA Cell Biol. 1996 Dec;15(12):1039-48.

Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. Connect Tissue Res. 2004;45(4-5):231-7.

Suri L, Damoulis PD, Le T, Gagari E. Expression of MMP-13 (collagenase-3) in long-term cultures of human dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2008 Aug;53(8):791-9.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. Blood. 1989 Oct;74(5):1563-70.

Suzuki H, Nezaki Y, Kuno E, Sugiyama I, Mizutani A, Tsukagoshi N. Functional roles of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2003 Aug;67(8):1737-43.

Takagi S, Simizu S, Osada H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. Cancer Res. 2009 Feb 15;69(4):1502-8.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13221-6.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tang W, Hemler ME. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. J Biol Chem. 2004 Mar 19;279(12):11112-8.

Thrailkill KM, Siddhanti SR, Fowlkes JL, Quarles LD. Differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF-I and IGFBPs. Bone. 1995 Sep;17(3):307-13.

Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. Bone. 1999 Jul;25(1):123-5.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. Stem Cell Rev. 2011 Sep;7(3):608-15.

Torii Y, Hitomi K, Tsukagoshi N. L-ascorbic acid 2-phosphate promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 mediated by accumulation of type I collagen. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1994 Jun;40(3):229-38.

Tuan RS. Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. Clin Orthop Relat Res. 2004 Oct;(427 Suppl):S105-17.

Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P. Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. J Bone Miner Res. 2000 Jul;15(7):1257-65.

Tuckermann JP, Vallon R, Gack S, Grigoriadis AE, Porte D, Lutz A, Wagner EF,Schmidt J, Angel P. Expression of collagenase-3 (MMP-13) in c-fos-induced osteosarcomas and chondrosarcomas is restricted to a subset of cells of the osteo-/chondrogenic lineage. Differentiation. 2001 Dec;69(1):49-57.

Tuuttila A, Morgunova E, Bergmann U, Lindqvist Y, Maskos K, Fernandez-Catalan C, Bode W, Tryggvason K, Schneider G. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 A resolution. J Mol Biol. 1998 Dec 11;284(4):1133-40.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul;87(14):5578-82.

van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K. Caveolae: anchored,multifunctional platforms in the lipid ocean. Trends Cell Biol. 2003 Feb;13(2):92-100.

Varghese S, Canalis E. Regulation of collagenase-3 by bone morphogenetic protein-2 in bone cell cultures. Endocrinology. 1997 Mar;138(3):1035-40.

Vincenti MP, Coon CI, Mengshol JA, Yocum S, Mitchell P, Brinckerhoff CE.Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13)from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). Biochem J. 1998 Apr 1;331 (Pt 1):341-6.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003 May 2;92(8):827-39.

Vogel WF, Aszódi A, Alves F, Pawson T. Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(8):2906-17.

Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. Mol Biol Cell. 2002 Jul;13(7):2502-17.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD,Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell. 1998 May 1;93(3):411-22.

Wagner W, Saffrich R, Wirkner U, Eckstein V, Blake J, Ansorge A, Schwager C,Wein F, Miesala K, Ansorge W, Ho AD. Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction. Stem Cells.2005 Sep;23(8):1180-91.

Wang H, Keiser JA. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Jun 16;272(3):900-5.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1231-40.

Wiles MV, Johansson BM. Analysis of factors controlling primary germ layer formation and early hematopoiesis using embryonic stem cell in vitro differentiation. Leukemia. 1997 Apr;11 Suppl 3:454-6.

Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. Am Surg. 1999 Jan;65(1):22-6.

Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine.Ann Med. 2004;36(8):584-95.

Williamson RA, Martorell G, Carr MD, Murphy G, Docherty AJ, Freedman RB, Feeney J. Solution structure of the active domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. A new member of the OB fold protein family. Biochemistry. 1994 Oct 4;33(39):11745-59.

Winchester SK, Bloch SR, Fiacco GJ, Partridge NC. Regulation of expression of collagenase-3 in normal, differentiating rat osteoblasts. J Cell Physiol. 1999 Dec;181(3):479-88.

Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. J Biol Chem. 1998 Dec 4;273(49):32988-94.

Xie H, Xue YX, Liu LB, Wang P, Liu YH, Ying HQ. Expressions of matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-14 associated with the activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human brain gliomas of different pathological grades. Med Oncol. 2011 Dec;28 Suppl 1:S433-8.

Xie M, Jiao T, Chen Y, Xu C, Li J, Jiang X, Zhang F. EMMPRIN (basigin/CD147) is involved in the morphogenesis of tooth germ in mouse molars. Histochem Cell Biol. 2010 May;133(5):585-94. doi: 10.1007/s00418-010-0697-7.

Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J Biophys Biochem Cytol. 1955 Sep 25;1(5):445-58.

Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. Cancer Res. 2009 Nov 15;69(22):8594-602.

Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. Stem Cells Dev. 2010 Apr;19(4):469-80.

Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. J Biol Chem. 2001 Mar 16;276(11):8403-8.

Yudoh K, Shi Y, Karasawa R. Angiogenic growth factors inhibit chondrocyte ageing in osteoarthritis: potential involvement of catabolic stress-induced overexpression of caveolin-1 in cellular ageing. Int J Rheum Dis. 2009 Jul;12(2):90-9.

Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV.Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors:RECK and TIMP-2. Mol Cell Biochem. 2009 Feb;322(1-2):143-50.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):7787-98. doi: 10.4049/jimmunol.0902318. Epub . Erratum in: J Immunol. 2010 Feb 1;184(3):1656.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng. 2006 Oct;12(10):2813-23.

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. Cell Biochem Funct. 2008 Aug;26(6):664-75.

Zeng Y, Rosborough RC, Li Y, Gupta AR, Bennett J. Temporal and spatial regulation of gene expression mediated by the promoter for the human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3)-encoding gene. Dev Dyn. 1998 Mar;211(3):228-37.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP,Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001 Apr;7(2):211-28.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA,Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res. 2000;2(6):477-88.

ANEXO 1

São Paulo, 07 de outubro de 2011.

Il^mo(a)^. S^r(a)^.

Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

Departamento de Bioquímica do *Instituto de Química*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Superexpressão e inibição do gene da Caveolina-1: influência na diferenciação celular de células-tronco de polpa dentária humana" - **Pesquisador(a) responsável:** Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva – **Co-Autor(es):** Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, Luiz Henrique Santos Silva - **Registro CEP-HU/USP**: 1141/11 – **SISNEP CAAE:** 0030.0.198.000-11.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 07 de outubro de 2011, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO,** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 07 de outubro de 2012.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

ANEXO 2

Título Projeto Mestrado: Superexpressão e Inibição do gene da Caveolina-1: Influência na Diferenciação Celular de Células-Tronco de Polpa Dentária Humana.

Objetivo Geral: este projeto pretende verificar se (I) a alteração da expressão gênica, tanto por superexpressão como por bloqueio (interferência) do gene da Cav-1 (Cav-1 α e Cav-1) pode modular a indução da diferenciação celular "in vitro" de células-tronco de polpa dentária humana (DPSCs) e (II) se a expressão das MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) são reguladas nestes processos.

Objetivos Específicos

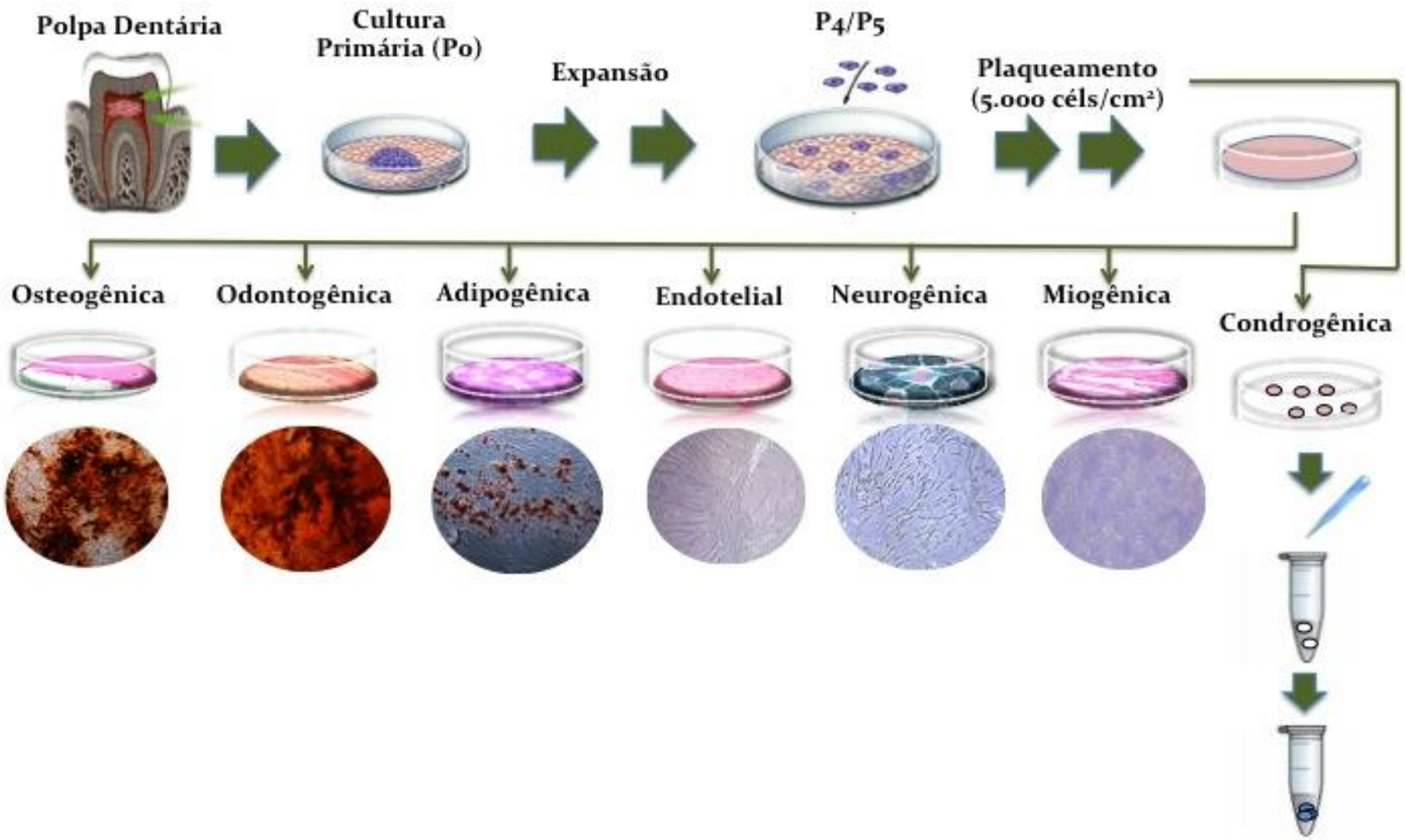
1) Superexpressão e inibição (shRNA) do gene da Cav-1 em DPSCs humana por lentivírus e retrovírus, respectivamente;

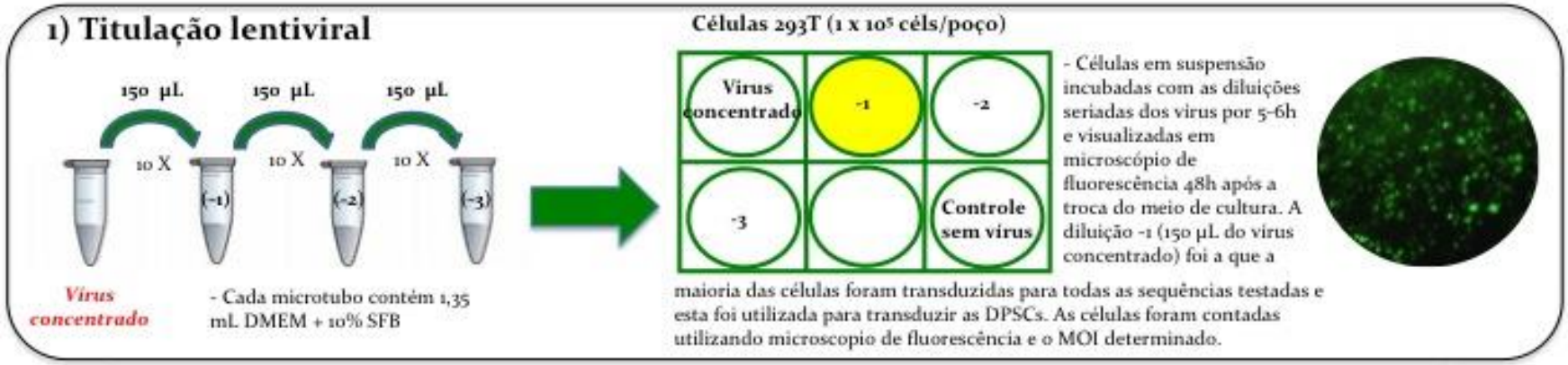
2) Avaliação da indução da diferenciação "in vitro" de DPSCs humana (osteogênica, miogênica, odontogênica, condrogênica, neurogênica, adipogênica e endotelial) em: I) células não modificadas geneticamente; II) células com superexpressão gênica da Cav-1 α ; III) células com superexpressão gênica da Cav-1 β ; IV) células com superexpressão gênica da Cav-1 (α e β); e V) células com inibição gênica da Cav-1, através da visualização por colorações específicas e marcadores genéticos por PCR em tempo real (qRT-PCR) após indução por meios de diferenciação específicos;

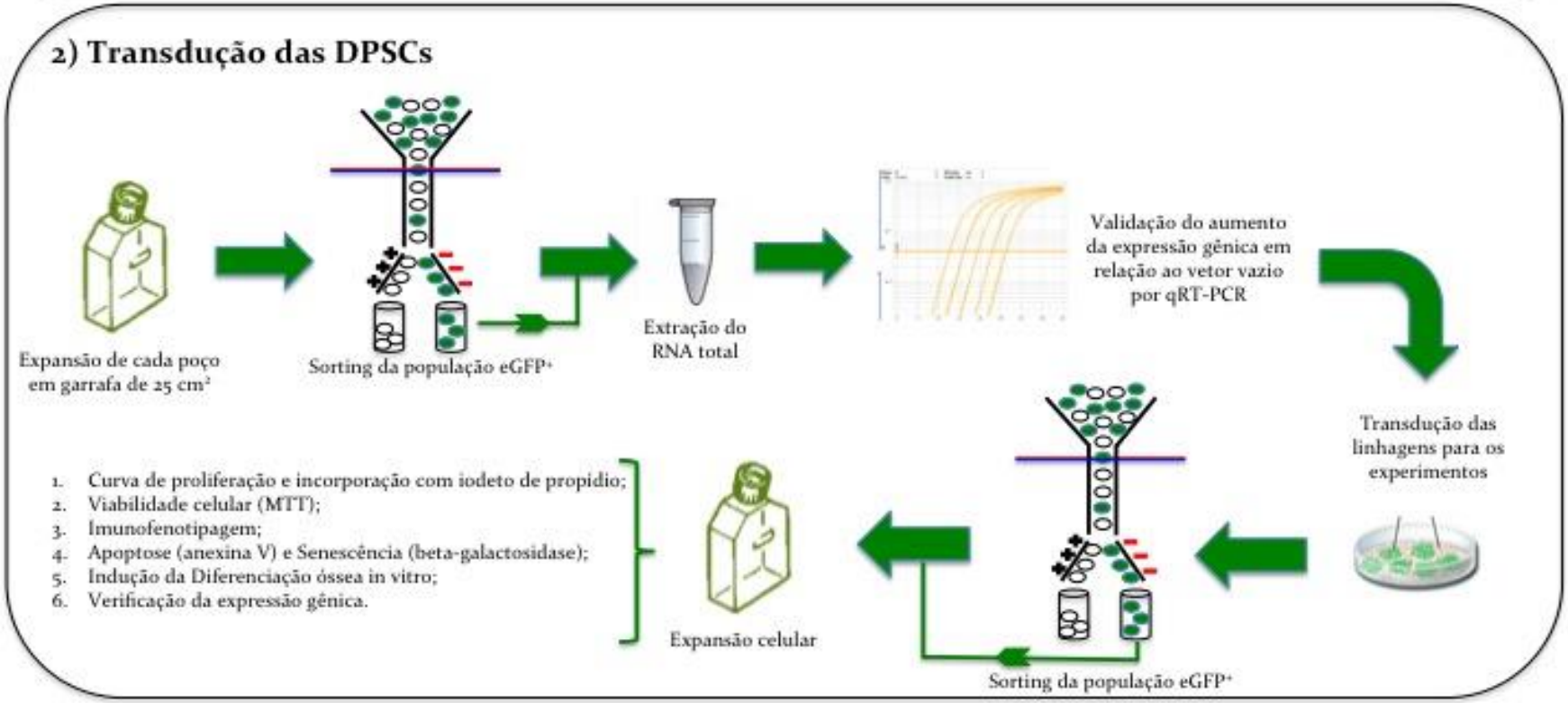
3) Avaliação da modulação da expressão gênica das MMPs, TIMPs, RECK, EMMPRIN/CD147, Caveolinas (1 a 3) e cavinas (1 a 4) por PCR em tempo real (qRT-PCR) após da indução da diferenciação "in vitro" de DPSCs humana (osteogênica, miogênica, odontogênica, condrogênica, neurogênica, adipogênica e endotelial) em: I) células não modificadas geneticamente; II) células com superexpressão gênica da Cav-1 α; III) células com superexpressão gênica da Cav-1β ; IV) células com superexpressão gênica da Cav-1 (α e β); e V) células com inibição gênica da Cav-1;

4) Avaliação da indução da proliferação celular, senescência ou apoptose após da indução da diferenciação “in vitro” de DPSCs humana (osteogênica, miogênica, odontogênica, condrogênica, neurogênica, adipogênica e endotelial) em: I) células não modificadas geneticamente; II) células com superexpressão gênica da Cav-1α ; III) células com superexpressão gênica da Cav-1β ; IV) células com superexpressão gênica da Cav-1 (α e β); e V) células com inibição gênica da Cav-1, por coloração específica e citometria de fluxo.

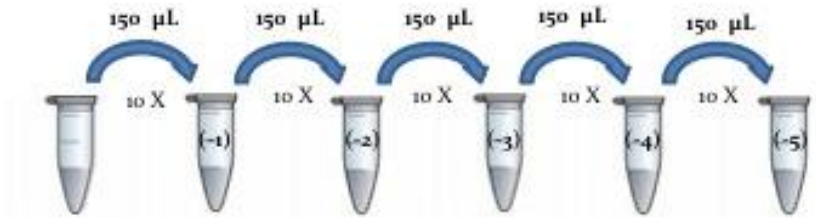
Potencial de Diferenciação Celular DPSCs (Mestrado Luiz Henrique Santos Silva – 1. parte)




1) Titulação lentiviral
150 µL
150 µL
150 µL
10 X
10 X
10 X
(-1)
(-2)
(-3)
Vírus concentrado
- Cada microtubo contém 1,35 mL DMEM + 10% SFB
Células 293T (1 x 10⁵ céls/poço)
Vírus concentrado
-1
-2
-3
Controle sem vírus
- Células em suspensão incubadas com as diluições seriadas dos vírus por 5-6h e visualizadas em microscópio de fluorescência 48h após a troca do meio de cultura. A diluição -1 (150 µL do vírus concentrado) foi a que a maioria das células foram transduzidas para todas as sequências testadas e esta foi utilizada para transduzir as DPSCs. As células foram contadas utilizando microscopio de fluorescência e o MOI determinado.

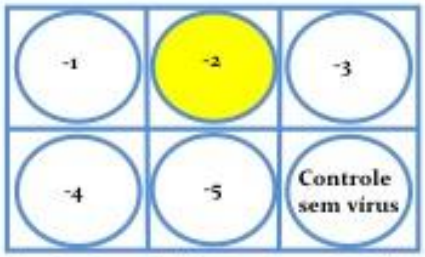

2) Transdução das DPSCs
Expansão de cada poço em garrafa de 25 cm²
Sorting da população eGFP⁺
Extração do RNA total
Validação do aumento da expressão gênica em relação ao vetor vazio por qRT-PCR
Transdução das linhagens para os experimentos
Sorting da população eGFP⁺
Expansão celular
1. Curva de proliferação e incorporação com iodeto de propídio;
2. Viabilidade celular (MTT);
3. Imunofenotipagem;
4. Apoptose (anexina V) e Senescência (beta-galactosidase);
5. Indução da Diferenciação óssea in vitro;
6. Verificação da expressão gênica.

1) Titulação retroviral



- Cada microtubo contém 1,35 mL DMEM + 10% SFB + 8 µg/mL polibreno

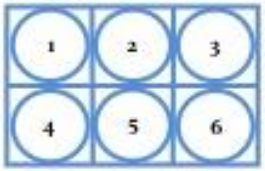
Células NIH3T3 (1×10^5 céls/poço)



- 24h após o plaqueamento, as células foram incubadas com as diluições seriadas dos vírus por 5-6h e adicionado puromicina 48h após a troca do meio de cultura. Células avaliadas por 7 -10 dias. A diluição -2 (15 µL do vírus concentrado) foi a que a maioria das células foram transduzidas para todas as sequências testadas e esta foi utilizada para transduzir as DPSCs.

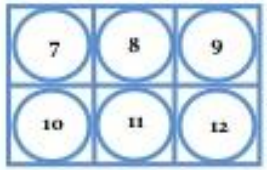
2) Transdução das DPSCs

Placa 1



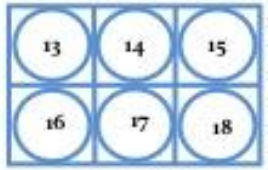
01: seq 1
02: seq 2
03: seq 3
04: seq 4
05: seq vetor vazio
06: controle sem vetor

Placa 2



07: seq 1 + seq 2
08: seq 1 + seq 3
09: seq 1 + seq 4
10: seq 2 + seq 3
11: seq 2 + seq 4
12: seq 3 + seq 4

Placa 3

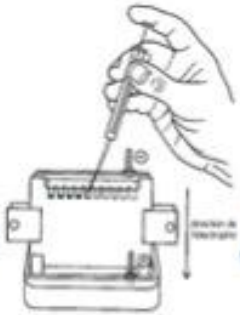


13: seq 1 + seq 2 + seq 3
14: seq 1 + seq 2 + seq 4
15: seq 2 + seq 3 + seq 4
16: seq 1 + seq 3 + seq 4
17: seq 1 + seq 2+ seq 3 + seq 4
18: seq vetor "scramble"

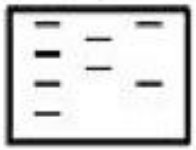
- Para cada gene, as 4 sequências de inibição foram testadas individualmente, duas a duas, três a três e todas juntas, tendo 15 possibilidades diferentes e posterior seleção com puromicina. As sequências vetor vazio e "scramble" não devem apresentar variações na quantidade de proteína do gene-alvo.

Expansão de cada poço em garrafa de 25 cm²

Purificação da proteína total



Western Blotting utilizando o anticorpo anti-gene-alvo



Validação e escolha da sequência que inibe, no mínimo, 70% da síntese protéica em relação ao vetor vazio e "scramble"

Transdução das linhagens para os experimentos

1. Curva de proliferação e incorporação com iodeto de propídio;
2. Viabilidade celular (MTT);
3. Imunofenotipagem;
4. Apoptose (anexina V) e Senescência (beta-galactosidase);
5. Indução da Diferenciação óssea in vitro;
6. Verificação da expressão gênica.