

LETÍCIA MIQUELITTO GASPARONI

**OSTEOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE
CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTÁRIA HUMANA:
PAPEL DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ
E SEUS INIBIDORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfológicas

Orientadora: Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

Gasparoni LM. Osteogênese *in vitro* a partir de células-tronco da polpa dentária humana: papel das metaloproteinases de matriz e seus inibidores [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Perdas ósseas decorrentes de lesões e traumas tem se tornado um problema de saúde pública em todo o mundo e ainda não existem substitutos ósseos ideais para o reparo ósseo. A bioengenharia óssea surge como uma nova alternativa às terapias convencionais e está baseada em três pilares: células, biomateriais e moléculas sinalizadoras. As células-tronco mesenquimais (MSCs) já foram isoladas de diversos órgãos e tecidos humanos e as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) têm se tornado atrativas devido ao seu potencial osteogênico expressivo. Já se sabe que as MSCs secretam diversos fatores, moléculas da matriz extracelular (MEC) e vesículas extracelulares que carreiam informações para a comunicação celular. A remodelação da MEC ocorre pelo balanço entre enzimas proteolíticas (metaloproteinases de matriz/MMPs), e seus inibidores (TIMPs e RECK) e são cruciais em diversos processos celulares. Pouco se sabe sobre a função do eixo MMPs/TIMPs/RECK na biologia das células-tronco, seja na manutenção do fenótipo indiferenciado ou na diferenciação osteogênica *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão das MMPs/TIMPs/RECK nas DPSCs bem como durante a indução da osteogênese *in vitro*. As DPSCs foram isoladas a partir de polpas dentárias saudáveis e expandidas, para a (I) caracterização do fenótipo mesenquimal (imunofenotipagem, curva de proliferação e tempo de dobramento populacional, viabilidade celular, senescência, formação de colônia, microscopia eletrônica de transmissão/MET e indução da diferenciação adipogênica), (II) perfil de expressão do Colágeno tipo I/Col I, MMPs/TIMPs/RECK por imunofluorescência (IF), (III) caracterização dos biomarcadores da osteogênese após a indução da diferenciação *in vitro* por 35 dias (MET, quantificação da atividade da fosfatase alcalina, expressão gênica e IF de Col I e mineralização por alizarina vermelha) e (IV) perfil de expressão gênica e protéica das MMPs/TIMPs/RECK. As DPSCs apresentaram positividade para os marcadores de superfície celular característicos de MSCs, alta taxa proliferativa, metabolismo celular adequado ao seu status celular, potencial clonogênico em baixa densidade, citoplasma contendo mitocôndrias alongadas e retículo endoplasmático rugoso bem como núcleos definidos e capacidade de diferenciação adipogênica. Col I, algumas MMPs, todas as TIMPs e RECK foram expressos nas DPSCs. Durante a indução da osteogênese, verificamos que transcritos foram modulados positivamente (MMPs -14, -15, -16, -17, -28, TIMPs -1, -3 e -4), negativamente (MMPs -1, -10, -13 e RECK) ou não tiveram diferença (MMPs -2, -3 e TIMP-2) em relação às DPSCs, já as MMPs -9, -19 e -25 não foram expressas. Os níveis protéicos das MMPs -2 e -14 foram mais elevados dos que das DPSCs de 28 a 35 dias, períodos relacionados à fase de mineralização. Desta forma, sugerimos que as MMPs/TIMPs/RECK podem desempenhar importantes funções para a manutenção do estado indiferenciado das DPSCs bem como podem atuar em diferentes estágios da diferenciação osteoblástica e na mineralização *in vitro*.

Palavras-chave: Células-tronco da polpa dentária humana. Matriz extracelular. Metaloproteinases de matriz. Inibidores de metaloproteinases de matriz. Osteogênese *in vitro*. Bioengenharia óssea.

ABSTRACT

Gasparoni LM. Osteogenesis *in vitro* from human dental pulp stem cells: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. [Master's thesis (Science Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Bone loss resulting from injuries and trauma has become a public health problem worldwide and there are still not ideal bone substitute for bone repair. Bone bioengineering emerges as a new alternative to conventional therapies and is based on three pillars: cells, biomaterials and signaling molecules. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from various human organs and tissues and dental pulp stem cells (DPSCs) have become attractive due to its significant osteogenic potential. It is known that MSCs secrete various factors, extracellular matrix molecules (ECM), and extracellular vesicles that carry information for cellular communication. The ECM remodeling occurs by the balance between proteolytic enzymes (matrix metalloproteinases/MMPs) and their inhibitors (TIMPs and RECK) and are crucial in many cellular processes. Little is known about the function of the axis MMPs/TIMPs/RECK on the stem cells biology either to maintaining the undifferentiated phenotype or during osteogenic differentiation *in vitro*. The objective of this study was to evaluate the expression profile of MMPs/TIMPs/RECK in DPSCs and during induction of osteogenesis *in vitro*. The DPSCs were isolated from healthy dental pulps and expanded for (i) the characterization of mesenchymal phenotype (immunophenotyping, proliferation curve and population doubling-time, cell viability, senescence, colony-forming unit, transmission electron microscopy/TEM and induction of adipogenic differentiation), (II) expression profile of type I collagen/Col I, MMPs/TIMPs/RECK by immunofluorescence (IF), (III) characterization of osteogenesis biomarkers after induction of differentiation *in vitro* for 35 days (TEM, quantification of alkaline phosphatase activity, Col I gene expression and IF and mineralization by alizarin red) and (IV) gene and protein expression profile of MMPs/TIMPs/RECK. The DPSCs were positive for cell surface markers characteristic of MSCs, high proliferative rate, cell metabolism suited to their cell status, clonogenic potential from low density, cytoplasm containing elongated mitochondria, well-defined endoplasmic reticulum and typical nuclear morphology and adipogenic differentiation capacity. Col I, some MMPs, all TIMPs and RECK were expressed in DPSCs. During induction of osteogenesis, we found that some transcripts were upregulated (MMPs -14, -15, -16, -17, -28, TIMP-1, -3 and -4), downregulated (MMPs -1, -10, -13 and RECK) or had no difference (MMPs -2, -3, and TIMP-2) in relation to DPSCs, however, MMPs -9, -19 and -25 were not expressed. The protein levels of MMP -2 and -14 were higher than DPSCs from 28 to 35 days, being periods related to the mineralization phase. Taken together, we suggest that MMPs/TIMPs/RECK may play important roles for the maintenance of the undifferentiated state of DPSCs and may act in either several steps of osteoblastic differentiation and mineralization *in vitro*.

Keywords: Human dental pulp stem cells. Extracellular matrix. Matrix metalloproteinases. Inhibitor of matrix metalloproteinases. Osteogenesis *in vitro*. Bone bioengineering.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, existem mais de 150 doenças e síndromes relacionadas ao aparelho locomotor (Castro-Silva et al., 2012). Cabe ressaltar que mais de 2,2 milhões de procedimentos utilizando enxertos ósseos são realizados anualmente em odontologia, neurocirurgia e ortopedia em todo o mundo (Boeckel et al., 2012). No Brasil, o Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) registrou em 2014, um aumento de 53% em relação ao ano anterior, dos transplantes ósseos que utilizam enxertos (Ministério da Saúde, 2014). Na prática clínica, o osso autógeno (do próprio paciente) é considerado padrão-ouro nas enxertas ósseas. Todavia, requer dois sítios cirúrgicos (doador e receptor), e em muitos casos, são necessárias grandes quantidades desse tecido, mas sua disponibilidade é limitada. Existe também a possibilidade de enxertos alógenos (osso de cadáver da mesma espécie – a partir de um Banco de Osso) ou xenógenos (osso de espécie diferente), mas ainda há o risco de transmissão de doenças e alto grau de insucesso por reabsorção óssea. Assim, novas alternativas têm sido buscadas para a geração de novos tecidos ósseos.

A Bioengenharia Tecidual é uma área multidisciplinar que se baseia nos princípios da engenharia aplicados às ciências da vida a fim de desenvolver substitutos biológicos capazes de manter, restaurar ou aprimorar a função de órgãos e tecidos. Esta é composta por três componentes: células, biomateriais e moléculas bioativas (Langer et al., 2016). Neste contexto, a Bioengenharia Óssea tem adotado como estratégia para a geração de novos tecidos ósseos, a utilização de células-tronco mesenquimais (MSCs) semeadas sobre biomateriais tridimensionais e fatores osteoindutivos.

Assim, o conhecimento dos mecanismos que controlam as MSCs tanto no seu estado indiferenciado como durante a osteogênese é crucial para o seu emprego no reparo e formação óssea. Para tanto, a determinação do perfil do secretoma (conjunto de todas as moléculas que são secretadas para o meio extracelular e ancoradas à superfície celular) destas células é um passo importante para conhecer sua matriz extracelular (componente integral de todos os tecidos conjuntivos), interações célula-célula, célula-matriz e compreender como ocorre o controle do seu microambiente. A remodelação da MEC ocorre pelo balanço entre

enzimas proteolíticas (metaloproteinases de matriz – MMPs), e seus inibidores (TIMPs e RECK) e são cruciais em diversos processos celulares. Pouco se sabe sobre a função do eixo MMPs/TIMPs/RECK na biologia das células-tronco, seja na manutenção do fenótipo indiferenciado ou na diferenciação osteogênica *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão das MMPs/TIMPs/RECK nas DPSCs bem como durante a indução da osteogênese *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-tronco

As células-tronco (“Stem Cells” – SCs) são definidas por terem a capacidade de auto-renovação (capacidade de gerar células-filhas indiferenciadas) e de diferenciação (capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células). As populações de SCs têm sido classificadas de acordo com o seu respectivo potencial de diferenciação em: (I) totipotentes (capazes de gerar todos os tecidos que formam o organismo humano, incluindo a placenta e anexos embrionários), como o zigoto; (II) pluripotentes (capazes de formar todos os tecidos que formam o organismo humano, excluindo a placenta e anexos embrionários, sendo encontradas somente na massa interna de embriões na fase de blastocistos – 5 ou 6 dias pós-fertilização), como as células-tronco embrionárias (“Embryonic Stem Cells” – ESCs); e (III) multipotentes (com potencial de diferenciação limitado a determinados tipos de células especializadas). As SCs multipotentes podem ser subdivididas em células-tronco fetais (“Fetal Stem Cells” – FSCs), localizadas no fluido e membrana amnióticos, sangue do cordão umbilical, cordão umbilical propriamente dito e placenta, e as células-tronco adultas ou somáticas (“Adult Stem Cells” – ASCs), que podem ser isoladas a partir de tecidos em desenvolvimento ou adultos com origem ectodérmica, endodérmica ou mesodérmica, tais como as células-tronco hematopoiéticas (“Hematopoietic Stem Cells” – HSCs) e as células-tronco mesenquimais (“Mesenchymal Stromal/Stem Cells” – MSCs) (Wu et al., 2016).

Recentemente, foram descobertas as células-tronco pluripotentes induzidas (“Induced Pluripotent Stem Cells” – iPSCs) através de técnicas de reprogramação celular de células adultas com a superexpressão de determinados fatores de transcrição, que possibilitou transdiferenciar uma célula diferenciada em indiferenciada, resgatando propriedades semelhantes às de ESCs (Takahashi et al., 2006).

Dentre as diversas populações de SCs, vale ressaltar que o uso terapêutico das ESCs tem sido cada vez mais desencorajado por essas células apresentarem problemas éticos em diversos países e por serem conhecidas por sua capacidade de desenvolver tumores benignos *in vivo*, chamados teratomas (composto por todos

os três folhetos embrionários). Assim, as ASCs (incluindo as HSCs e MSCs) bem como as iPSCs têm sido as células mais estudadas para a aplicação em terapias regenerativas (Wu et al., 2016).

2.1.1 Células-tronco mesenquimais

Alexander Maximow e Alexander Friedenstein foram pesquisadores que se destacaram na hematologia experimental russa e hoje seus méritos são reconhecidos em todo o mundo. Maximow postulou a teoria unitária da hematopoiese (onde uma única célula progenitora no mesênquima seria capaz de gerar outros tipos de células sanguíneas) somente décadas mais tarde Friedenstein e seus colaboradores, reconhecendo a pesquisa de Maximow, isolaram da medula óssea, de forma pioneira, uma população de células distinta das HSCs, com morfologia fibroblastóide, capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em linhagens mesenquimais (osteoblastos, adipócitos e condrócitos) e de reconstruir um estroma hematopoiético (Friedenstein et al., 1968, 1970, 1974). Essas células foram chamadas de células-tronco estromais (“Stromal Stem Cells”) (Owen et al., 1988) e mais tarde a nomenclatura foi adaptada para células-tronco mesenquimais (Caplan, 1991). Devido ao grande crescimento das pesquisas com células mesenquimais e sua possibilidade de isolamento a partir de todos os tecidos de um organismo, em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular adotou a nomenclatura de células mesenquimais estromais (“Mesenchymal Stromal Cells”) e propôs a definição dos critérios mínimos para que estas células sejam consideradas MSCs (Dominici et al., 2006).

As MSCs já foram isoladas e caracterizadas de diversas regiões do corpo humano, tais como medula óssea (“Bone Marrow Stem Cells” – BMSCs) (Friedenstein et al., 1966), tecido adiposo (“Adipose Tissue Stem Cells” – ADSCs) (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 aminiotícicos (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 (Zvaipler 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, 2003), periósteo (De et al., 2001, 2006; Nakahara et al., 1991), cartilagem 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).

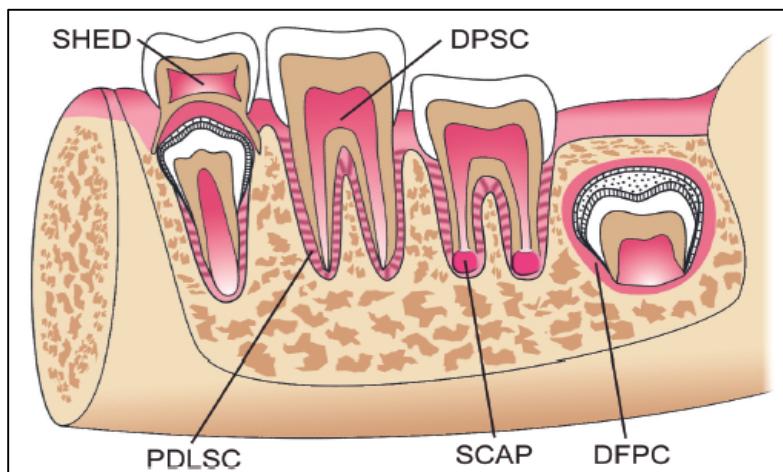
Embora as MSCs derivadas dos diversos tecidos e órgãos compartilhem propriedades biológicas básicas, existem disparidades substanciais entre elas, incluindo: (I) diferenças no potencial de expansão sob condições idênticas de cultivo celular (Kern et al., 2006); (II) diferenças no potencial de diferenciação nas linhagens mesenquimais clássicas e (III) diferenças na expressão dos marcadores de superfície celular (Baksh et al., 2007). No entanto, estas possuem vantagens e desvantagens. Por exemplo, as BMSCs são as melhores caracterizadas e estudadas, sendo, atualmente, o padrão-ouro para as MSCs. Contudo, a coleta é dolorosa, invasiva, possui baixo rendimento e a punção de medula óssea é, geralmente, destinada aos bancos de medula para transplante.

2.1.2 Células-tronco dentais

No início dos anos 2000, as células-tronco dentais (“Dental Stem Cells” – DSCs) foram isoladas e caracterizadas em humanos e, até o momento, cinco populações de MSCs distintas foram categorizadas: (I) durante o desenvolvimento dentário: no folículo dentário (“Dental Follicle Stem Cells” – DFSCs) (d'Aquino et al., 2011; Morsczeck et al., 2005) e na papila apical (“Stem Cells from Apical Papilla” – SCAPs) (Sonoyama et al., 2006, 2008); (II) no indivíduo adulto: no ligamento periodontal (“Periodontal Ligament Stem Cells” – PDLSCs) (Seo et al., 2004), na polpa dentária de dentes decíduos (“Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth” – SHEDs) (Miura et al., 2003), na polpa dentária de dentes permanentes (“Dental Pulp Stem Cells” – DPSCs) (Gronthos et al., 2000) (Figura 1). Dentre elas, as DPSCs têm se mostrado promissoras para uso clínico devido a sua fácil obtenção e sua capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares (Hilkens et al., 2013; Masthan et al., 2013; Stanko et al., 2013).

Torna-se evidente que as diferentes populações de DSCs, também possuem diferenças no potencial de expansão, de multi-diferenciação e na expressão dos marcadores de superfície celular (Chen et al., 2012).

Figura 1 – Células-tronco dentais



Representação esquemática das cinco populações de células-tronco dentais identificadas. Fonte: (Bojic et al., 2014).

2.1.2.1 Células-tronco da polpa dentária (DPSCs)

A polpa dentária é um tecido dentário não-mineralizado composto de tecido conjuntivo frouxo, povoada por sangue, vasos sanguíneos e nervos que ocupam a parte central da cavidade pulpar de todos os dentes. As DPSCs são células-tronco derivadas do ectomesênquima, originárias da migração das células da crista neural e possuem propriedades mesenquimais, tais como morfologia fibroblastóide, aderência à superfície de cultivo celular e formação de colônias *in vitro*. Muito tem se estudado sobre a localização destas células na polpa, ou seja, o seu nicho tecidual. Até o momento, parece haver um consenso de que o nicho perivascular seja a principal fonte destas células, mas há a possibilidade delas serem encontradas em nichos perineurais (Zhang et al., 2016).

As DPSCs apresentam maior taxa proliferativa, formação de colônias, potencial clonogênico e de mineralização em relação às BMSCs. Elas possuem como marcadores de superfície celular: CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD146, STRO-1 e não expressam os marcadores hematopoiéticos: CD34, CD45, CD11b. As DPSCs têm sido empregadas para a regeneração de diversos órgãos, tais como

pâncreas, dente, osso, coração, tecido ocular e nervoso (Ledesma-Martinez et al., 2016; Mead et al., 2016; Nuti et al., 2016).

2.2 Microambiente

Virtualmente, as MSCs podem residir em locais específicos de todos os tecidos, chamados nichos teciduais, sendo então, potencialmente isoladas. Com isso, elas têm sido elencadas como promissoras para a regeneração tecidual devido à possibilidade de migrarem para os locais de injúria tecidual, de se diferenciarem e, ainda, por modularem a resposta imune *in vivo*. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que poucas MSCs são encontradas nos tecidos lesionados, mas suas propriedades no reparo tecidual podem estar relacionadas à secreção de moléculas com efeitos parácrinos. Neste contexto, o conhecimento do Secretoma celular se faz decisivo para a compreensão do microambiente gerado por estas células e seu potencial terapêutico. Já se sabe que as MSCs secretam diversas citocinas, fatores de crescimento, fatores solúveis, moléculas da matriz extracelular (MEC) e vesículas extracelulares que carreiam informações (diversos tipos de RNA, proteínas, lipídeos, etc) diversas para a comunicação celular (Koniusz et al., 2016).

No que diz respeito aos processos de manutenção das propriedades de indiferenciação destas células no seu nicho tecidual ou para o seu comprometimento e diferenciação em uma linhagem específica, a MEC é um componente-chave. Em função disso, muitos biomateriais têm sido desenvolvidos para diversas aplicações em Bioengenharia Tecidual para mimetizar a MEC do tecido correspondente (Hinderer et al., 2016). Não somente a composição da MEC, como também suas propriedades biofísicas (rigidez, stress mecânico, porosidade, etc) e as interações célula-MEC modulam a diferenciação celular (Kim et al., 2016; Kshitiz et al., 2012; Ravindran et al., 2015; Reilly et al., 2010; Tatullo et al., 2016; Tse et al., 2011; Vincent et al., 2013). Dada essa importância, criou-se uma plataforma *on-line* chamada “Projeto Matrissoma” que compila os dados *in silico* e *in vivo* dos componentes da MEC bem como os genes relacionados (Naba et al., 2016).

A remodelação da MEC ocorre pelo balanço entre a ação de enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteinases de matriz (“Matrix Metalloproteinases” – MMPs), de seus inibidores teciduais (“Tissue Inhibitors of Matrix

Metalloproteinases” – TIMPs) e de seu inibidor ancorado à membrana celular (“Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs” – RECK). A maioria das MMPs ocupa um 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, 2006) 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 à destruição tecidual e alteração da composição da MEC (Gialeli et al., 2011; Kessenbrock et al., 2010; Malemud, 2006).

As MMPs representam a família de enzimas responsáveis pela clivagem de todos os componentes da MEC, sendo as únicas capazes de clivar colágenos fibrilares (Curran et al., 1999). Tradicionalmente, a função biológica das MMPs tem sido associada à 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 à 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 pesquisas utilizando estudos de degradômica e proteômica em modelos de animais *knockout* para as MMPs têm mudado o dogma sobre as MMPs, mostrando que elas podem ter funções dúbias, tanto protetoras quanto deletérias para os tecidos dependendo do processo biológico envolvido (Pulkoski-Gross, 2015; Schlage et al., 2015).

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-MEC, assim gerando moléculas bioativas (matriquinas) (Bauvois, 2012; Butler et al., 2009; Lopez-Otin et al., 2009; Mannello et al., 2012; Rodriguez et al., 2010; Wells et al. 2015).

2.2.1 Metaloproteinases de matriz

As MMPs de mamíferos são classificadas como solúveis e insolúveis (“Membrane-Type MMP” – MT-MMP), que apresentam um domínio de ancoramento à membrana plasmática. Já foram identificados 26 genes de MMPs em humanos, sendo nomeadas em ordem cronológica de descobrimento ou agrupadas em função da similaridade da estrutura e substrato (Quadro 1). Elas são produzidas como pró-enzimas ou zimogênio. As MMPs que são secretadas para a MEC são exportadas como pró-MMPs e ativadas extracelularmente por outras MMPs ativas ou outras enzimas, enquanto que as MMPs ancoradas à membrana plasmática são ativadas intracelularmente no complexo de Golgi e já estão ativas quando incorporadas à membrana celular (Figura 2) (Paiva, Granjeiro, 2014).

A subfamília das MT-MMPs é compreendida por seis membros, sendo que as MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24 (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP, respectivamente) são ancoradas à membrana celular por um domínio hidrofóbico transmembrana do tipo I, seguido de uma cauda citossólica que interage com proteínas intracelulares relacionadas a várias vias de sinalização e, ainda, possuem uma conformação diferente do sítio catalítico (“MT-loop”), outra característica que as difere das demais MMPs. Enquanto que as MMP-17 e MMP-25 (MT4-MMP e MT6-MMP, respectivamente) não apresentam o domínio transmembrana, a cauda citossólica e nem o “MT-loop”, mas são ancoradas à face extracelular da membrana celular via âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) e apresentam uma região adicional (“stem” ou “stalk”), entre o domínio hemopexina e a âncora GPI, contendo de 2 a 3 cisteínas que proporcionam a formação de pontes dissulfeto, promovendo a homodimerização destas enzimas na superfície celular, sugerindo que estas enzimas apresentam um conjunto de funções bem distinto das demais MMPs (Itoh, 2015).

As MT-MMPs desempenham um papel importante na ativação de pró-MMPs secretadas para a MEC.

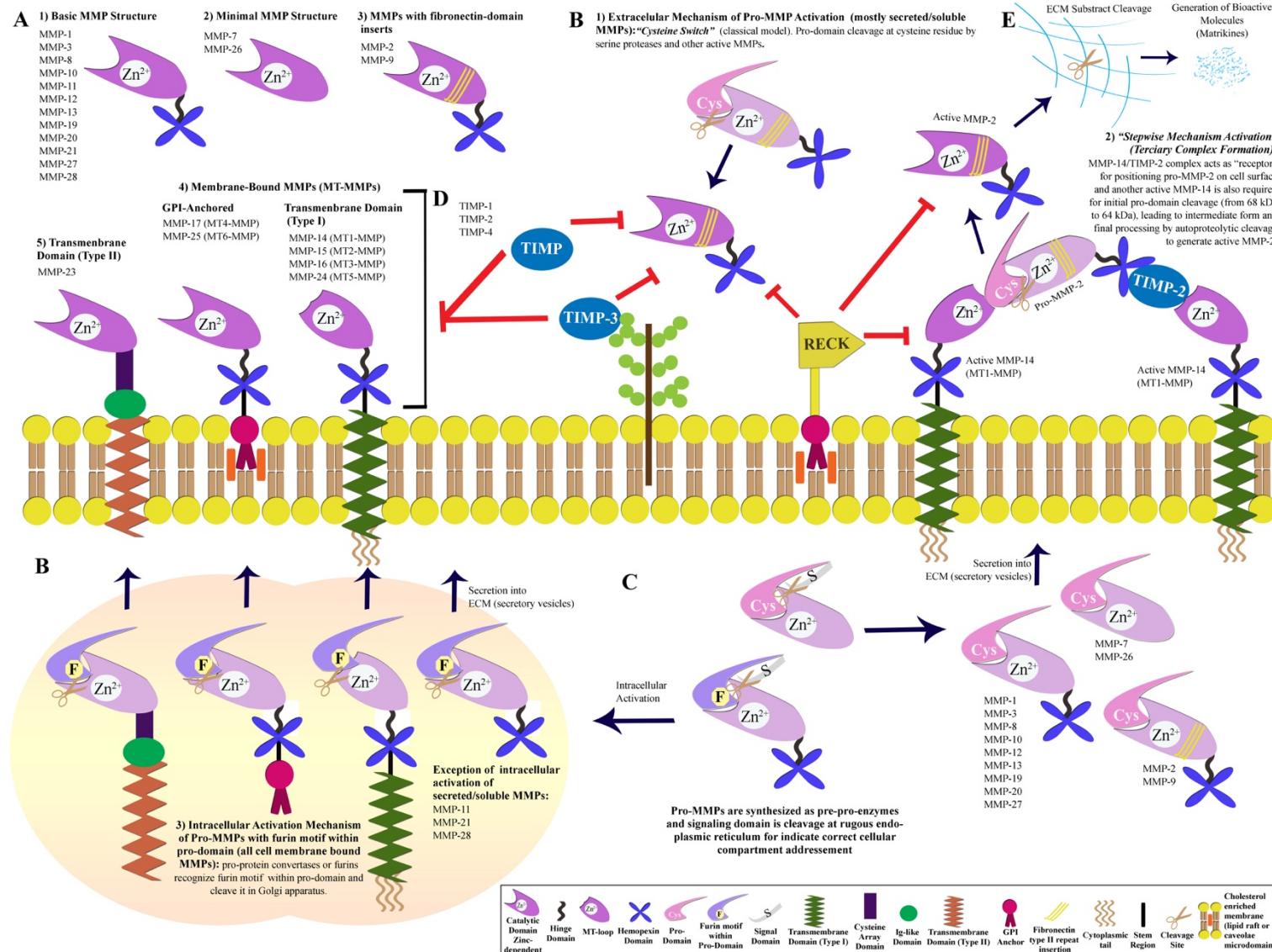
Quadro 1 – Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos

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	Col 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, endotelia grande, LTBP1, Galactina-3. Col 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.
	9	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV de 92 kDa	92/86	Col 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.
Estromelisinas	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, perlecana, 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-α, CTGF, APP.
	15	MT2-MMP	72/60	Col I, IV, gel, agrecana, fibronectina, fibrilina, tenascina C, laminina-1, nidogênio, tTG, perlecana, LDL-RP, fibronectina.
	16	MT3-MMP	64/52	Col II, III, gel, caseína, vitronectina, fibronectina, tTG, agrecana, 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 à heparina.
	26	Endometase ou Matrilisina-2	-	Col IV, fibronectina, vitronectina.
Outras	12	Metaloelastase Macrofágica, Elastase Macrofágica	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	Metaloelastase Colagenase-4 (<i>Xenopus</i>)	-	Col IV, gelatina, tenascina, agrecana, IGFBP-3, laminina-5 (γ2), nidogênio-1, COMP.
	19	RASI-1	54/22	Amelogenina, Col XVIII, agrecana, COMP.
	20	Enamelisina	-	-
	21	Homóloga ao <i>Xenopus</i> XMMP	54/46-41	Agrecana.
	27	CMMP (<i>chicken</i>) ou MMP associada à Artrite Reumatóide	-	-
	28	Cisteína Array MMP (CA-MMP), Femalisina, MIFR ou MMP-21/MMP-22# Epilisina	55/?	-

Sem Grupo	-	Mcol-A (<i>mouse</i>) Mcol-B (<i>mouse</i>) Gelatinase de 75-kDa (<i>Chicken</i>)	-	-	
-----------	---	---	---	---	--

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

Figura 2 – Metaloproteínases de matriz e seus inibidores



Fonte:
(Paiva, Granjeiro, 2014).

Apesar do mecanismo de ativação da pró-MMP-2 já ter sido amplamente estudado pela formação do complexo ternário MMP-2/MMP-14/TIMP-2, todas as MT-MMPs, exceto a MMP-17, podem ativar a pró-MMP-2 (Bigg et al., 1997; Llano et al., 1999; Pei, 1999; Strongin et al., 1995; Takino et al., 1995; Velasco et al., 2000). Ainda, o recrutamento das TIMPs também é bastante diferente daquele apresentado pela MMP-14. Além da MMP-2, outras MMPs podem ser ativadas pelas MT-MMPs, com exceção da MMP-24 (não se conhece nenhuma MMP que seja ativada por ela).

2.2.2 Inibidores das MMPs

As MMPs são fortemente reguladas aos níveis transcricional, pós-transcricional, protéico via seus ativadores e inibidores e interação com componentes específicos da MEC (Fanjul-Fernandez et al., 2010). A expressão gênica destas enzimas é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas vias de sinalização, tais como ésteres de forbol, sinais derivados de integrinas, hormônios, fatores de crescimento, oncogenes, citocinas, proteínas da MEC, regulação epigenética, stress celular, alteração na morfologia e EMMPRIN/CD147 (“Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer”) (Benbow et al., 1997; Clark et al., 2008). Já ao nível da inibição enzimática, tanto a pró-enzima como a enzima ativa podem ser inibidas na MEC por seu inibidor, situado na membrana plasmática (RECK) (Takahashi et al., 1998) e no perímetro pericelular, ou por aqueles secretados na MEC (TIMPs) (Baker et al., 2002), presentes em locais mais distantes do sítio de secreção da enzima. O balanço entre as MMPs e seus inibidores é um pré-requisito necessário para o funcionamento de eventos fisiopatológicos envolvendo a remodelação da MEC. RECK é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana celular e inibe, exclusivamente, a MMP -2 (Takahashi et al., 1998), MMP-9 e MMP-14 (Oh et al., 2001), mas há indícios de que a MMP-7 possa ser um possível alvo (Omura et al., 2009).

2.3 Osteogênese

O esqueleto dos mamíferos pode ter diferentes origens embrionárias: mesoderma paraxial, placa lateral do mesoderma e ectoderma da crista neural, os

quais originam o esqueleto axial e o esqueleto apendicular. Embora os ossos sejam formados por osteoblastos que secretam uma matriz óssea específica, sua distinta ontogenia se reflete em distintas vias de sinalizações e funções (Chung et al., 2014; Franz-Odendaal, 2011). A osteogênese ocorre por dois principais mecanismos: ossificação intramembranosa, onde há a direta diferenciação de MSCs em osteoblastos e ossificação endocondral, onde as MSCs se diferenciam em condroblastos, formando uma matriz cartilaginosa, que, progressivamente, é substituída por osteoblastos e matriz óssea. Ambos os mecanismos requerem extensa remodelação da MEC.

As MSCs induzidas à diferenciação osteogênica *in vitro* relembram os mecanismos de diferenciação que ocorrem na ossificação intramembranosa. Assim, ao longo deste processo, podemos correlacionar o grau de diferenciação das MSCs com a expressão temporal de genes específicos e secreção de diversas moléculas. Inicialmente, as MSCs se diferenciam em células progenitoras osteocondrais, as quais podem se comprometer com a linhagem osteogênica ou condrogênica. Quando estas células assumem a direção da diferenciação osteogênica, passam a expressar o fator de transcrição RUNX2. A partir disso, identificamos células osteoprogenitoras, osteoblastos imaturos e maduros, podendo chegar a se diferenciarem em osteócitos, entrarem em apoptose ou se manterem no estado quiescente terminalmente. Estas células passam a ter alta capacidade secretória e a expressar colágeno tipo I, fosfatase alcalina e diversas proteínas ósseas até a mineralização. O processo de diferenciação *in vitro* é induzido por meio de cultura suplementado por ácido ascórbico (necessário para a síntese de colágeno tipo I), dexametasona (glicocorticoide) e β-glicerofosfato (fonte de fosfato) (Paiva, Granjeiro, 2014).

2.3.1 MMPs e seus inibidores no tecido ósseo

Desde a descoberta da MMP-13 em ossos longos de ratos (Walter et al., 1963), mais da metade das MMPs conhecidas, têm sido demonstradas no tecido ósseo em diversas espécies, tais como a MMP-1 (Cawston et al., 1998), MMP-2 (Lefebvre et al., 1991), MMP-9 (Reponen et al., 1994), MMP-3 (Keyszer et al., 1998), MMP-10 (Bord et al., 1998) e MMP-14 (Holmbeck et al., 1999), sendo que as MMPs

-9, -13 e -14 são as mais expressas. Muitas anormalidades ósseas ou retardamento no desenvolvimento ósseo foram observadas em animais *knockout* para os genes da MMP-2 (Itoh et al., 1997), MMP-9 (Vu et al., 1998), MMP-13 (Inada et al., 2004; Stickens et al., 2004), MMP-14 (Holmbeck et al., 2005) e duplo *knockout* das MMP-14/MMP-16 (Shi et al., 2008).

Desde a descoberta de que células ósseas secretavam inibidores de colagenases (Cawston et al., 1981), posteriormente identificados 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 et al., 1997). Entretanto, as outras TIMPs também são expressas em elementos do esqueleto durante o desenvolvimento em humanos e camundongos (Apte et al., 1997; Blavier et al., 1997; Bord et al., 1999; Flenniken et al., 1990; Huang et al., 2002; Meikle et al., 1991; Rifas et al., 1994; Shen et al., 2010; Su et al., 1996; Zeng et al., 1998). Para estes inibidores, os animais *knockout* para as TIMPs não apresentaram fenótipo ósseo anormal. Recentemente, a descrição de RECK e sua importante regulação da MEC em tecidos mineralizados tem sido demonstrada, tais como na amelogênese (Paiva et al., 2009), ossificação intramembranosa e endocondral (Paiva – dados não publicados) e na palatogênese (de Oliveira Demarchi et al., 2010). Os animais *knockout* para RECK morreram 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.

Pouco se sabe sobre a função do complexo sistema envolvendo o eixo MMPs/TIMPs/RECK na biologia das células-tronco, seja para a manutenção do fenótipo indiferenciado ou na diferenciação osteogênica. Recentemente, poucos trabalhos descreveram algumas MMPs que são expressas por MSCs derivadas da medula óssea, tecido muscular e adiposo, sua distribuição e atividade enzimática pericelular e na MEC, sugerindo que este conhecimento pode ser importante para modular o uso terapêutico dessas células em Terapia Celular e Bioengenharia de Tecidos (Lozito et al., 2014).

Com isso, nosso grupo de pesquisa está engajado no estudo da função das MMPs e seus inibidores e nos mecanismos que controlam a diferenciação osteogênica em DPSCs.

3 CONCLUSÃO

Sugerimos que as MMPs/TIMPs/RECK podem desempenhar importantes funções para a manutenção do estado indiferenciado das DPSCs bem como podem atuar em diferentes estágios da diferenciação osteogênica e na mineralização *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

- Ahmad M, Takino T, Miyamori H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biochem.* 2006 Mar; 139(3):517-26.
- Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995 Mar 17; 270(11):5872-6.
- Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J.* 1999 May 15; 340 (Pt 1):171-81.
- Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol.* 2002 Oct; 55(5):300-4.
- 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.
- Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4):425-41.
- 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.
- Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol.* 1999 Jan 25; 144(2):373-84.
- Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 2001 May 25; 276(21):18415-22.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. 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.

Berton A, Lorimier S, Emonard H, Laurent-Maquin D, Hornebeck W, Bellon G. Contribution of the plasmin/matrix metalloproteinase cascade to the retraction of human fibroblast populated collagen lattices. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000 Mar; 3(3):173-80.

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem.* 1997 Jun 13; 272(24):15496-500.

Boeckel DG, Shinkai RS, Grossi ML, Teixeira ER. Cell culture-based tissue engineering as an alternative to bone grafts in implant dentistry: a literature review. *J Oral Implantol.* 2012 Sep; 38 Spec No:538-45.

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopoulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 2005 Feb 11; 120(3):303-13.

Bojic S, Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. *Histol Histopathol.* 2014 Jun; 29(6):699-706.

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.

Buttner FH, Hughes CE, Margerie D, Lichte A, Tschesche H, Caterson B, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J.* 1998 Jul 1; 333 (Pt 1):159-65.

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.

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

Castro-Silva II, Zambuzzi WF, de Oliveira CL, Granjeiro JM. Periosteal-derived cells for bone bioengineering: a promising candidate. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Oct; 23(10):1238-42.

Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials.* 2012 Sep; 33(27):6320-44.

Chung CG, James AW, Asatrian G, Chang L, Nguyen A, Le K, et al. Human perivascular stem cell-based bone graft substitute induces rat spinal fusion. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Oct; 3(10):1231-41.

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(6-7):1362-78.

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

d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, De Angelis GC, Laino L, et al. Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. *Eur Cell Mater.* 2011 Mar 22;21:304-16.

d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1997 Dec 15; 250(3):751-7.

Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14; 277(24):21352-60.

De BC, 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 BC, Dell'Accio F, Vandenneebele 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 BC, Dell'Accio F, Vanlaue J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006 Apr; 54(4):1209-21.

De S, Pascher T, Maiti M, Jespersen KG, Kesti T, Zhang F, et al. Geminate charge recombination in alternating polyfluorene copolymer/fullerene blends. *J Am Chem Soc.* 2007 Jul 11; 129(27):8466-72.

Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV, Strongin AY. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22; 277(12):9749-56.

Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.

Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci.* 2004 Feb 29; 117(Pt 6):889-97.

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

Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays.* 1999 Nov; 21(11):940-9.

Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, et al. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17; 278(42):40764-70.

English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem.* 2000 May 12; 275(19):14046-55.

English WR, Velasco G, Stracke JO, Knauper V, Murphy G. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett.* 2001 Feb 23; 491(1-2):137-42.

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

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

Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan; 1803(1):3-19.

Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999 Nov 12; 85(10):906-11.

Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*. 2000 Dec 15; 486(3):247-51.

Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, Salo T, Tryggvason K. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem*. 1984 Aug 10; 259(15):9783-9.

Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25; 267(27):19470-4.

Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem*. 1994 Oct 14; 269(41):25742-6.

Franz-Odendaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011; 16:2734-46.

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.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*. 1974 Apr; 17(4):331-40.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar; 6(2):230-47.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec; 16(3):381-90.

Fukui N, McAlinden A, Zhu Y, Crouch E, Broekelmann TJ, Mecham RP, et al. Processing of type II procollagen amino propeptide by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18; 277(3):2193-201.

Gao G, Plaas A, Thompson VP, Jin S, Zuo F, Sandy JD. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12; 279(11):10042-51.

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.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994 Aug 18; 370(6490):555-7.

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.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 1997 Jul 11; 277(5323):225-8.

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.

Hahn-Dantona EA, Aimes RT, Quigley JP. The isolation, characterization, and molecular cloning of a 75-kDa gelatinase B-like enzyme, a member of the matrix metalloproteinase (MMP) family. An avian enzyme that is MMP-9-like in its cell expression pattern but diverges from mammalian gelatinase B in sequence and biochemical properties. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29; 275(52):40827-38.

Hao YQ, Niu ZY, Wang GQ, Zhou XD, Hu T. [Expression of matrixmetalloproteinase-8 on the bell-stage in human and rat tooth development]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2004 Feb; 22(1):26-8.

Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest.* 2000 Jan; 105(2):143-50.

Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells.* 2008 Jul; 26(7):1695-704.

Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013 Jul; 353(1):65-78.

Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20; 275(42):33008-13.

Hinderer S, Layland SL, Schenke-Layland K. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Feb 1; 97:260-9.

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell.* 1998 Oct 30; 95(3):365-77.

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, et al. 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.

Hwang IK, Park SM, Kim SY, Lee ST. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Oct 1; 1702(1):79-87.

Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997 Mar 15; 322 (Pt 3):809-14.

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

Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, et al. 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.

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

Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015 May; 44-46:207-23.

Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol.* 2006 Jan; 206(1):1-8.

Jazedje T, Perin PM, Czeresnia CE, Maluf M, Halpern S, Secco M, et al. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *J Transl Med.* 2009; 7:46.

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001 May 28; 153(5):893-904.

Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15; 277(46):44061-7.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter 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.

Kim SY, Park SM, Lee ST. Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 6; 339(1):47-54.

Kim Y, Ko H, Kwon IK, Shin K. Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int Neurourol J.* 2016 May; 20(Suppl 1):S23-S29.

Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10:109.

Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 2000 Feb 7; 148(3):615-24.

Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, Muir D. Metalloproteinase-dependent predegeneration *in vitro* enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci.* 2002 Dec 1; 22(23):10408-15.

Kshitiz, Park J, Kim P, Helen W, Engler AJ, Levchenko A, et al. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integr Biol (Camb).* 2012 Sep; 4(9):1008-18.

- Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016 Jan; 51(1):8-12.
- Leedesma-Martinez E, Mendoza-Nunez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:4709572.
- Lemaitre V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006 Mar; 78(1):1-10.
- Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9; 93(14):7069-74.
- Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Oct; 42(11):2517-24.
- Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, et al. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 1999 Jun 1; 59(11):2570-6.
- Lopez-Otin 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.
- Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol.* 2014 Feb; 34:132-43.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006; 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 metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem.* 2012 Mar; 47(1):27-58.
- Mannello F, Toni 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.
- Masthan KM, Sankari SL, Babu NA, Gopalakrishnan T. Mystery inside the tooth: the dental pulp stem cells. *J Clin Diagn Res.* 2013 May; 7(5):945-7.

McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*. 2000 Aug 18; 289(5482):1202-6.

Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *Stem Cells*. 2016 Jun 7.

Mecham RP, Broekelmann TJ, Fliszar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18; 272(29):18071-6.

Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. 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.

Ministério da Saúde, 2014. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/14806-intoregistraamento-de-53-em-transplantes-de-ossos-no-pais>. Accessed June 01, 2015.

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

Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res*. 2004 Jan 15; 64(2):665-71.

Monea S, Jordan BA, Srivastava S, DeSouza S, Ziff EB. Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J Neurosci*. 2006 Feb 22; 26(8):2300-12.

Morszeck C, Langendorfer 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.

Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, et al. 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.

Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix Biol*. 2016 Jan; 49:10-24.

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.

Noth 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.

Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev.* 2016 May 30.

Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, Kleiner DE, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, et al. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry.* 1994 Nov 29; 33(47):14109-14.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001 Dec 14; 107(6):789-800.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 1997 Jan 24; 272(4):2446-51.

Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, et al. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem.* 2009 Feb 6; 284(6):3461-9.

Overall CM. Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. *Biochem J.* 2004 Nov 1; 383(Pt. 3):e5-e7.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988; 136:42-60.

Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov 1; 561:74-87.

Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, et al. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics. *Cyotherapy.* 2010 May; 12(3):275-87.

Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26; 274(13):8925-32.

Pulkoski-Gross AE. Historical perspective of matrix metalloproteases. *Front Biosci (Schol Ed).* 2015; 7:125-49.

Ravindran S, George A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Front Physiol.* 2015; 6:118.

Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech.* 2010 Jan 5; 43(1):55-62.

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, et al. 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.

Rodriguez 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.

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.

Schlage P, Auf dem KU. Proteomic approaches to uncover MMP function. *Matrix Biol.* 2015 May; 44-46:232-8.

Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials.* 2010 Jan; 31(3):467-80.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004 Jul 10; 364(9429):149-55.

Shi J, Son MY, Yamada S, Szabova L, Kahan S, Chrysovergis K, et al. Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. *Dev Biol.* 2008 Jan 1; 313(1):196-209.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006; 1:e79.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008 Feb;34(2):166-71

Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Oct 18.

- Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*. 2004 Dec; 131(23):5883-95.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995 Mar 10; 270(10):5331-8.
- Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, et al. 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, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126(4):663-76.
- Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem*. 1995 Sep 29; 270(39):23013-20.
- Tatullo M, Marrelli M, Falisi G, Rastelli C, Palmieri F, Gargari M, et al. Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016 Mar; 29(1):3-8.
- Tondreau AM, Milsmann C, Patrick AD, Hoyt HM, Lobkovsky E, Wieghardt K, et al. Synthesis and electronic structure of cationic, neutral, and anionic bis(imino)pyridine iron alkyl complexes: evaluation of redox activity in single-component ethylene polymerization catalysts. *J Am Chem Soc*. 2010 Oct 27; 132(42):15046-59.
- Tse JR, Engler AJ. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One*. 2011; 6(1):e15978.
- Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*. 2000 Feb 15; 60(4):877-82.
- Vincent LG, Engler AJ. Stem cell differentiation: Post-degradation forces kick in. *Nat Mater*. 2013 May; 12(5):384-6.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. 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.
- Wells JM, Gaggar A, Blalock JE. MMP generated matrikines. *Matrix Biol*. 2015 May; 44-46:122-9.

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.

Wu J, Izpisua Belmonte JC. Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. Cell. 2016 Jun 16; 165(7):1572-85.

Zhang Z, Nor F, Oh M, Cucco C, Shi S, Nor JE. Wnt/beta-Catenin Signaling Determines the Vasculogenic Fate of Postnatal Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells. 2016 Jun; 34(6):1576-87.

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

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