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 Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

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 Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gasparoni, Letícia Miquelitto.
Osteogênese *in vitro* a partir de células-tronco da polpa dentária humana: papel das metaloproteinases de matriz e seus inibidores / Letícia Miquelitto Gasparoni. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Bioengenharia e Biotecnologia.

Versão do título para o inglês: Osteogenesis *in vitro* from human dental pulp stem cells: role matrix metalloproteinases and their inhibitors

1. Células-tronco 2. Matriz extracelular 3. Metaloproteinases 4. Inibidores de metaloproteinases de matriz 5. Osteogênese 6. Bioengenharia óssea I. Paiva, Katiucia da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0113/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Letícia Miquelitto Gasparoni.

Título da Dissertação: Osteogênese *in vitro* a partir de células- tronco da polpa dentária humana: papel das metaloproteinases de matriz e seus inibidores.

Orientador(a): Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.

PARECER 1269/CEPSH
CAAE: 51097315.7.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Superexpressão e Inibição gênic da MMP-14 em Células-tronco da Polpa Dentária Humana Semeadas em Biomaterial Colágeno-quitosana: Influência na Osteogênese in vitro e in vivo*" da pesquisadora Profa. Dra. **Katiúcia Batista da Silva Paiva** e da aluna **Letícia Miquelitto Gasparoni**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria desta CEP em **16.12.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **18** nas fls. **16** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Katiucia Batista da Silva Paiva,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Superexpressão e Inibição Gênica da MMP-14 em Células-tronco da Polpa Dentária Humana Semeadas em Biomaterial Colágeno-quitosana: Influência na Osteogênese in vivo e in vitro.*" do qual participam o(s) aluno(s) **Letícia Miquelitto Gasparoni** iniciação científica **Nayara Aparecida Rolim ,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **27.05.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 02 de junho de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

São Paulo, 20 de abril de 2015.

Ilmo(a). Sr(a).
Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva
Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Terapia gênica associada à bioengenharia tecidual óssea: superexpressão e inibição de Metaloproteinase de Matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs e RECK) em osteoblastos originados de células-tronco mesenquimais humanas semeados em colágeno-quitosana"
Pesquisador responsável: Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva
Equipe de Pesquisa: Mari Cleide Sogayar, José Mauro Granjeiro
CAAE-SISNEP: 0031.0.198.000-11
Registro CEP-HU/USP: 1142/11

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 17 de abril de 2015, analisou e APROVOU o Relatório Parcial datado de 13 de abril 2015, sendo **alterada a Equipe de Trabalho** para: José Mauro Granjeiro, Il-Sei Watanabe, Cecilia Helena Gouveia Ferreira, Sônia Maria Malmonge, Leticia Miquelitto Gasparoni, Cristiane Fernandes Bronzeri, Tayná Brunheroto Contessoto, Leonardo Braun Galvão Maximo Dias, Ricardo The Chen, Alef de Campos Silva, Diego Garcia Miranda, Leticia Marinho Silva Rocha e o **prazo de término prorrogado** para: 31/02/2016 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP.

O Projeto deverá ser cadastrado na Plataforma Brasil (projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil) tal qual foi aprovado por este CEP em 21/10/2011. Após a validação deverá ser submetida uma emenda solicitando com as alterações acima citadas, inclusive a troca da Instituição Proponente para o Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Reiteramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê relatórios semestrais, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, nº 466, de 12 de dezembro de 2012, inciso X.1-3, letra "b". **O próximo relatório esta previsto para 17 de outubro de 2015.**

Atenciosamente,

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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 - São Paulo - SP
Tels.: (11) 3091-9457 – Email: cep@hu.usp.br

São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

Il^mo(a)^. Sr^(a)^.
Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva
Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Superexpressão e inibição gênica da MMP-14 em células-tronco da polpa dentária humana semeadas em biomaterial colágeno-quitosana: influência na osteogênese *in vitro* e *in* vivo"
Pesquisador(a) responsável: Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva
Pesquisador executante: Letícia Miquelitto Gasparoni
CAAE: 51097315.7.3001.0076
Registro CEP-HU/USP: 1519/16

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 19 de fevereiro de 2016 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 parciais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra "d".

O primeiro relatório está previsto para 19 de agosto de 2016.

Atenciosamente,

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

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tel.: (11) 3091-9457 – E-mail: cep@hu.usp.br

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO Nº 19/2015

Certifico que o Projeto "Terapia Gênica Associada à Bioengenharia Tecidual Óssea: Superexpressão e Inibição de Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e seus Inibidores (TIMPs e RECK) em Osteoblastos originados de Células-Tronco Mesenquimais Humanas Semeados em Colágeno-quitosana", desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 13/05/2015.

We attest that the project entitled "Terapia Gênica Associada à Bioengenharia Tecidual Óssea: Superexpressão e Inibição de Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e seus Inibidores (TIMPs e RECK) em Osteoblastos originados de Células-Tronco Mesenquimais Humanas Semeados em Colágeno-quitosana", developed under the responsibility of Dr. **Katiucia Batista da Silva Paiva**, is in agreement with the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 5/15/2015.

São Paulo, 13 de maio de 2015

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aparecida e Paulo, que sempre incentivaram a busca pelo conhecimento.

Às minhas irmãs, Jéssica e Verônica, de quem tenho tanto orgulho.

Ao meu esposo, Vinícius, pela cumplicidade e por me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, em primeiro lugar, pela minha família, pelo meu trabalho e pela Sua presença em minha vida.

Ao meu querido pai, **Paulo**, que é minha inspiração de que com trabalho árduo e honestidade qualquer um pode vencer na vida. Agradeço por tudo que hoje sou e pelos valores que aprendi com você. Sua simplicidade e paciência são virtudes nas quais quero sempre me espelhar.

À minha querida mãe, **Aparecida**, quem me educou, acreditou no meu potencial, apoiou e incentivou minhas escolhas. Você é uma grande vencedora, nunca mediu esforços para que eu ou minhas irmãs fossemos atrás dos nossos sonhos. Grande visionária e com um coração que não cabe no peito. Sua fé, garra e dedicação fazem-me ter orgulho de ser sua filha.

À minha querida irmã, **Jéssica**, se eu pudesse resumir você uma palavra seria: determinação. Você é obstinada e não desiste do que quer. Sabe se impor como ninguém, é uma pessoa maravilhosa e merece tudo de melhor. Te admiro muito!

À minha querida irmã, **Verônica**, não há problemas nem dificuldades que te façam desistir. Você luta pelo o que acredita e é com admiração que olho para a sua forma de encarar a vida. Tenho orgulho de ser sua irmã!

Ao meu esposo, **Vinícius**, por saber que tenho em você a minha paz e tranquilidade. Por estar comigo em todos os momentos e apoiar o que é importante para mim. Sou muito feliz por você existir na minha vida.

Ao **Rocky**, por toda alegria que você me dá.

Nossa família é tudo para mim!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), instituição que me permitiu conhecer pessoas maravilhosas.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), em nome do diretor **Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt**.

Ao Departamento de Anatomia da USP, na pessoa do seu chefe **Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.**

À **Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais.

À **Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva**, minha orientadora e coordenadora do Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular e Interação Celular (LabMec), por ter me dado um voto de confiança ao permitir que eu fizesse parte de seu grupo de pesquisa. Deixo aqui minha gratidão pelos ensinamentos.

Aos colegas do LabMec: **Cristiane Fernandes Bronzeri, Diego Garcia Miranda, Tayná Brunheroto Contessoto, Letícia Marinho Silva Rocha, Ricardo The Chen, Alef de Campos Silva** e **Leonardo Braun Galvão Máximo Dias** pela convivência e colaboração na realização desse trabalho. Somos um grupo!

Ao **Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer,** vulgo "Tio Bauer", grande inspirador e exemplo a ser seguido, com quem tive o privilégio de conviver durante a Disciplina Conceitos, Métodos e Diagnósticos em Biologia Tecidual.

Aos professores do Departamento de Anatomia, **Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara, Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale** e **Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt** por gentilmente disponibilizarem o uso equipamentos em seus laboratórios de pesquisa e aos alunos e técnicos desses laboratórios por toda ajuda.

Ao **Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe**, por todo o apoio durante a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Às técnicas **Marta Maria da Silva Righetti** e **Sônia Regina Yokomizo de Almeida** do Laboratório Multiusuário de Histologia e Microscopia Eletrônica do ICB, por toda a assistência e companhia. Agradeço também ao **Sebastião Boleta.**

À **Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, Profa. Dra. Maria Fernanda Forni** e **Profa. Dra. Marina Trombetta Lima** pelas importantes sugestões dadas à essa pesquisa durante o exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues** e à **Rosana Duarte Prisco** pelo amparo na análise estatística.

Ao **Prof. Marco Túlio de Souza**, coordenador da especialização em Periodontia da São Leopoldo Mandic/MG e **Prof. Leandro Stecca**, meu professor de Periodontia da graduação, por me incentivarem a fazer o Mestrado.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (IQ), em especial à **Profa. Dra. Leticia Labriola**, do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC), gostaria de agradecer pelo espaço cedido em seu laboratório, onde eu pude iniciar os experimentos antes da mudança para o Departamento de Anatomia. Às alunas do LMMC: **Dra. Letícia Ferreira Terra, Ancély Ferreira dos Santos, Rosangela Aparecida Wailemann Manzano** e **Talita Cristina Oliveira** por toda ajuda e à técnica **Sandra Regina de Souza**.

Ao **Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto**, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas: Biotecnologia, Ambiental e Aplicações, por compartilhar seu espaço e equipamentos. Sempre fui muito bem recebida em seu laboratório. Gostaria de agradecer também ao técnico **Leonardo Zambotti Villela**, pelo apoio.

Ao Núcleo de Terapia Celular e Molecular (Nucel), em nome da **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**, em especial aos seus alunos **Dr. Carlos Pereira, Gabriel Levin** e **Túlio Pereira**, pela assistência no uso do Citômetro de Fluxo.

À técnica **Elisa dos Santos**, do Departamento de Estomatologia, da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP), pela prontidão.

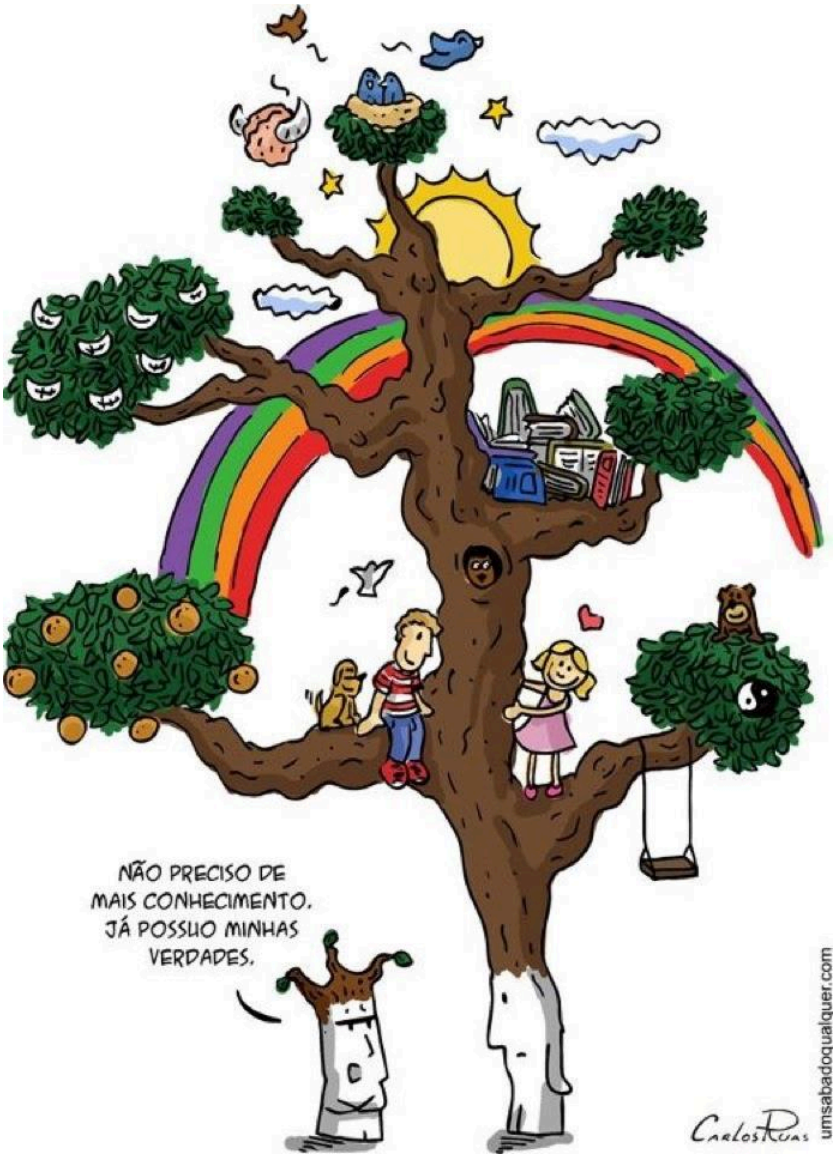
Ao **Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial - Divisão de Odontologia** do **Hospital Universitário da USP**, onde coletamos as polpas dentárias usadas nesse projeto.

Aos funcionários da USP: da limpeza (em especial à **Osmara Oliveira**), da portaria (**Adonil de Almeida**, **Agnaldo da Silva**, **Cícero Pereira**, **José Carlos Gonçalves, Marcelo Guedes** e **Mário Augusto**), da secretaria, da biblioteca da FOUSP e do ICB (em especial à **Tereza Cristina Soutto Mayor**), do biotério do IQ (**Silvânia Neves, Flávia Ong** e **José Galeote**). A todos, meu sincero muito obrigada!

À **FAPESP**, por acreditar na importância desse projeto e pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva à pesquisa durante esse período.

Este trabalho teve o apoio financeiro da FAPESP
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Processo n° 2014/1395-1

EPÍGRAFE


NÃO PRECISO DE MAIS CONHECIMENTO. JÁ POSSUO MINHAS VERDADES.
umsabadoqualquer.com
Carlos Ruas

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 osteblástica 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 be 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.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células-tronco dentais.....33
Figura 2 – Metaloproteinases de matriz e seus inibidores.....39
Figura 3 – Posicionamento dos terceiros molares na cavidade oral.....44
Figura 4 – Componentes dentários e polpa coletada.....44
Figura 5 – Estratégia dos tubos com os marcadores usados para a imunofenotipagem.....47
Figura 6 – Caracterização morfológica das DPSCs.....63
Figura 7 – Ensaio de formação de colônia.....64
Figura 8 – Ensaios de proliferação celular e viabilidade.....65
Figura 9 – Imunofenotipagem das DPSCs.....66
Figura 10 – Imunofluorescência das DPSCs (Col I).....67
Figura 11 – Coloração por Oil Red.....68
Figura 12 – Imunofluorescência das DPSCs (colagenases, gelatinases e matrilisinas).....69
Figura 13 – Imunofluorescência das DPSCs (estromilisinas, outros e MT-MMPs).....71
Figura 14 – Imunofluorescência das DPSCs (MT-MMPs) 72
Figura 15 – Imunofluorescência das DPSCs (Inibidores das MMPs).....73
Figura 16 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (Col I).....74
Figura 17 – Quantificação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*.....75
Figura 18 – Coloração de alizarina vermelha durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (análise macroscópica).....76
Figura 19 – Coloração de alizarina vermelha durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (análise microscópica).....77
Figura 20 – Análise da ultraestrutura das células durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*.....78
Figura 21 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (colagenases).....86
Figura 22 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (gelatinases e outros).....87

Figura 23 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (estromelisinas).....88
Figura 24 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (MT-MMPs).....89
Figura 25 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (MT-MMP e inibidor de MMP).....90
Figura 26 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (inibidores de MMPs).....91
Figura 27 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (inibidores de MMPs).....92
Figura 28 – Expressão protéica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*.....93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos.....37
Quadro 2 – Dados dos doadores das DPSCs utilizadas neste trabalho.....45
Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados na Imunofenotipagem.....48
Quadro 4 – Sequências dos primers utilizados e tamanho do fragmento amplificado (amplicon).....55
Quadro 5 – Variação da normalização global dos genes endógenos candidatos.....57
Quadro 6 – Variação da normalização entre os grupos da amostra.....57
Quadro 7 – Especificações dos anticorpos e peso molecular utilizados para western blot e imunofluorescência.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MEM – *Alpha Minimum Essential Medium*

ADSCs – *Adipose-Derived Stem Cells* (Células-tronco do tecido adiposo)

ALP – *Alkaline Phosphatase* (Fosfatase alcalina)

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância)

APC – *Allophycocyanin* (Aloficocianina)

ASCs – *Adult Stem Cells* (Células-tronco adultas)

BMSCs – *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (Células-tronco da medula óssea)

CD – *Cluster of Differentiation* (Grupamento de diferenciação ou cluster de diferenciação)

cDNA – DNA complementar

CEP – Comitê de ética em pesquisa

COL I – Colágeno tipo I

DEPC – *Diethylpyrocarbonate* (Dietilpirocarbonato)

DFSCs – *Dental Follicle Stem Cells* (Células-tronco do folículo dentário)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPSCs – *Dental Pulp Stem Cells* (Células-tronco da polpa dentária)

DSCs – *Dental Stem Cells* **(**Células-tronco dentais)

EMMPRIN/CD147 – *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (Indutor Extracelular das MMPs)

DTT – *Dithiothreitol* (Ditiotreitol)

ESCs – *Embryonic Stem Cells* (Células-tronco embrionárias)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

FACS – *Fluorescente activated cell sorting*

FITC – *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)

FSCs – *Fetal Stem Cells* (Células-tronco fetais)

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído 3-fostato desidrogenase)

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HSCs – *Hematopoietic Stem Cell* (Células-tronco hematopoiéticas)

HU – Hospital Universitário

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IgG1 – Imunoglobulina G1 kappa

INTO – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

iPSCs – *induced Pluripotent Stem Cells* (Células-tronco pluripotentes induzidas)

IQ – Instituto de Química

JAC – Junção amelo-cementária

MEC – Matriz extracelular

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MMPs – *Matrix Metalloproteinases* (Metaloproteinases de matriz)

mRNA – RNA mensageiro

MSCs – *Mesenchymal Stem Cells* (Células-tronco mesenquimais)

MT-MMP – *Membrane-type MMP* (MMP ancorada à membrana celular)

MTT – *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

#P1 – Primeira passagem da célula em cultura

#P4 – Quarta passagem da célula em cultura

#P5 – Quinta passagem da célula em cultura

P6 – Placa de multipoços para cultivo celular com 6 poços

P12 – Placa de multipoços para cultivo celular com 12 poços

P24 – Placa de multipoços para cultivo celular com 24 poços

P96 – Placa de multipoços para cultivo celular com 96 poços

P35 – Placa para cultivo celular com diâmetro de 35 milímetros

P60 – Placa para cultivo celular com diâmetro de 60 milímetros

P100 – Placa para cultivo celular com diâmetro de 100 milímetros

PBSA – Solução salina sem cálcio e sem magnésio

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PE – *Phycoerythrin - Texas Red-X* (Ficoeritrina)

PDLSCs – *Periodontal Ligament Stem Cells* (Células-tronco do ligamento periodontal)

qRT-PCR – PCR em tempo real

q.s.p. – Quantidade suficiente para

RECK – *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Transcrição Reversa

SCAPs – *Stem Cells from Apical Papilla* (Células-tronco da papila apical)

SCs – *Stem Cells* (Células-tronco)

SFB – Soro fetal bovino

SHEDs – *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* (Células-tronco da polpa dentária de dentes decíduos)

TD – Tempo de dobramento

TIMPs – *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases* (Inibidores Teciduais de MMPs)

TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator de Crescimento Transformante)

USP – Universidade de São Paulo

vs. – Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

< – Menor

≤ – É menor ou igual a

α – Alpha

β – Beta

® – Marca registrada

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

µg/mL – Micrograma por mililitro

µg/µL – Micrograma por microlitro

CO_2 – Gás carbônico

cm^2 – Centímetro quadrado

g – Grama

g – Força Gravitacional

h – Hora

H_2O – Água

kDa – Quilodalton

Log – Logaritmo

M – Molar

mA – Miliampère

mM – Milimolar

min – Minuto

mL – Mililitro

mg/mL – Miligrama por mililitro

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

nm – Nanometro

pH – Potencial hidrogeniônico

pM – Picomolar

rpm – Rotações por minuto

U/µL – Unidades por microlitro

U/mL – Unidades por mililitro

V – Volt

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T – Timina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....28
2 REVISÃO DA LITERATURA.....30
2.1 Células-tronco.....30
2.1.1 Células-tronco mesenquimais.....31
2.1.2 Células-tronco dentais.....32
2.1.2.1 Células-tronco da polpa dentária (DPSCs) 33
2.2 Microambiente.....34
2.2.1 Metaloproteinases de matriz.....36
2.2.2 Inibidores das MMPs.....40
2.3 Osteogênese.....40
2.3.1 MMPs e seus inibidores no tecido ósseo. 41
3 OBJETIVOS.....43
3.1 Objetivos específicos.....43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....44
4.1 Coleta e isolamento das DPSCs.....44
4.2 Caracterização das DPSCs 45
4.2.1 Imunofenotipagem.....46
4.2.2 Curva de proliferação.....46
4.2.2.1 Tempo de dobramento populacional.....46
4.2.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT) 49
4.2.4 Ensaio de senescência.....49
4.2.5 Ensaio de formação de colônia.....49
4.2.6 Indução da diferenciação adipogênica.....50
4.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 50
4.3 Osteogênese *in vitro*.....51
4.3.1 Quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP).....51
4.3.2 Coloração e quantificação da alizarina vermelha.....52
4.3.3 Perfil de expressão gênica (PCR em tempo real) 52
4.3.3.1 Extração do RNA total, transcrição reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qRT-PCR) 52
4.3.3.2 Análise do melhor gene endógeno.....54
4.3.4 Perfil de expressão protéica (western blotting) 54

4.3.4.1 Coleta, extração e quantificação de proteína total.....54
4.3.4.2 Preparo das amostras e preparo do gel.....58
4.3.4.3 Eletroforese.....58
4.3.4.4 Imunobloting e revelação da membrana.....59
4.3.4.5 *Normalização dos Resultados* 61
4.3.5 Imunofluorescência.....61
4.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 61
4.4 Análise Estatística dos Resultados.....61
5 RESULTADOS 63
5.1 Caracterização das DPSCs.....63
5.2 Avaliação da expressão das MMPs e seus inibidores nas DPSCs.....67
5.3 Avaliação da osteogênese *in vitro* a partir das DPSCs.....74
5.4 Avaliação da expressão gênica das MMPs e seus inibidores nas DPSCs durante a osteogênese *in vitro*.....79
5.5 Avaliação da expressão protéica após a indução da osteogênese *in vitro*.....85
6 DISCUSSÃO.....94
6.1 Identificação das MMPs/TIMPs/RECK nas DPSCs.....95
6.2 Modulação da expressão gênica das MMPs/TIMPs/RECK durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* a partir das DPSCs.....97
7 CONCLUSÃO.....98
REFERÊNCIAS 99
APÊNDICE.....120
A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....120

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 enxertias 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 (“Embrionic 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 aminióticos (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, 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).

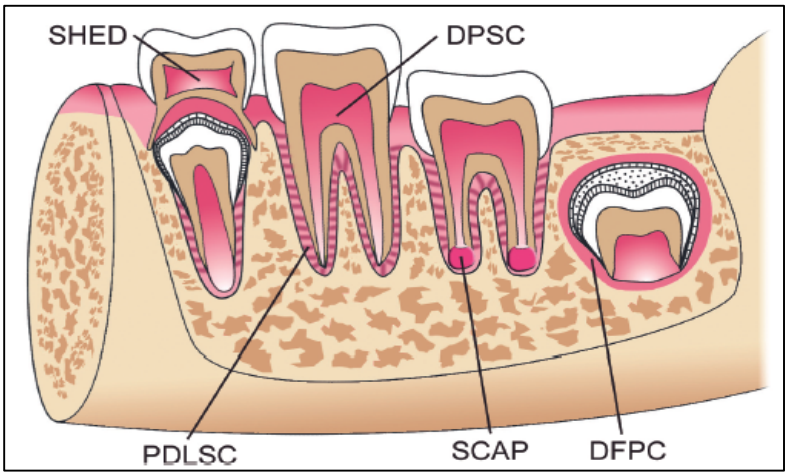
Embora as MSCs derivadas dos diversos tecidos e órgãos compartilhem propriedades biológicas básicas, existem disparidades substanciais entre elas, incluindo: (I) diferenças no potencial de expansão sob condições idênticas de cultivo celular (Kern et al., 2006); (II) diferenças no potencial de diferenciação 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 Deciduos 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.

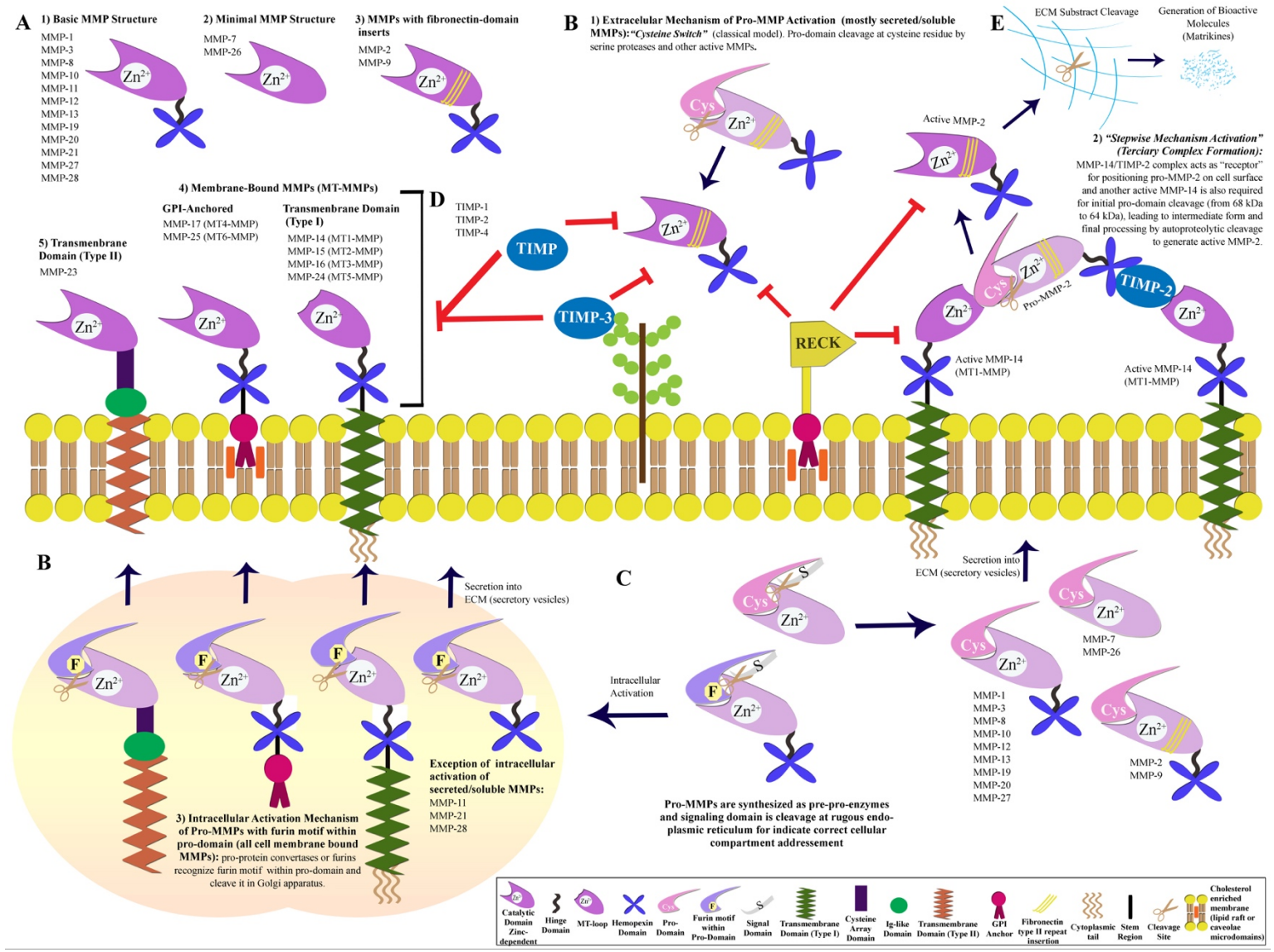
Quadro 1 – Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos

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, endotelina grande, LTBP1, Galactina-3.
	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, 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 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 (*Xenopus*)		
	19	RASI-1	-	Col IV, gelatina, tenascina, agrecana, IGFBP-3, laminina-5 (γ2), nidogênio-1, COMP.
	20	Enamelisina	54/22	Amelogenina, Col XVIII, agrecana, COMP.
	21	Homóloga ao *Xenopus* XMMP	-	-
	27	CMMP (*chicken*) ou MMP associada à Artrite Reumatóide	54/46-41	Agrecana.
		Cisteína Array MMP (CA-MMP), Femalisina, MIFR ou MMP-21/MMP-22¥		-
	28	Epilisina	55/?	-

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*), 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 – Metaloproteinases 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 especifica, 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 sunstituída 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 (glicocórticoide) 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 OBJETIVOS

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*.

3.1 Objetivos específicos

01) 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);
02) Análise do perfil de expressão do Colágeno tipo I/Col I, MMPs/TIMPs/RECK por imunofluorescência (IF);
03) 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);
04) Análise do perfil de expressão gênica e protéica das MMPs/TIMPs/RECK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e isolamento das DPSCs

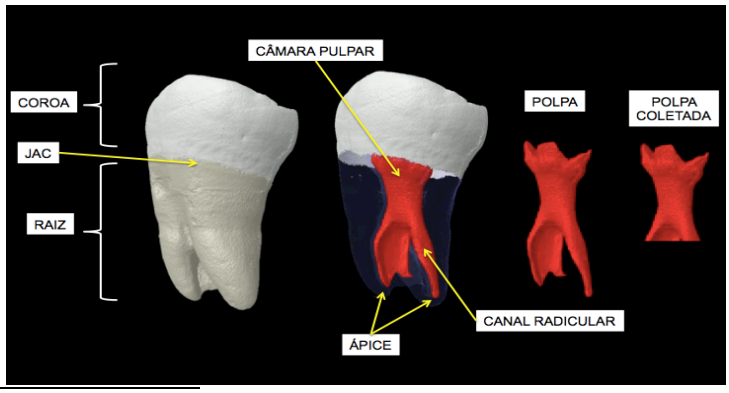
Os dentes permanentes de indivíduos adultos foram coletados junto à Divisão de Odontologia do Hospital Universitário (HU) da USP (Comitê de ética em pesquisa (CEP) HU/USP:1142/11 – SISNEP CAAE: 0031.0.198.000-11). Foram utilizados dentes saudáveis (sem doença periodontal e sem cárie), com indicação de remoção cirúrgica para a saúde oral (terceiros molares inclusos, semi-inclusos ou erupcionados) (Figura 3) e com a prévia autorização do paciente (assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

Figura 3 – Posicionamento dos terceiros molares na cavidade oral

Representação esquemática do posicionamento dos terceiros molares na cavidade oral, conforme seu nível de erupção. Fonte: Google imagens

A coroa e a raiz dentária foram seccionadas na junção amelo-cementária (JAC), em seguida, a polpa foi coletada apenas da câmara pulpar (Figura 4). Essa foi transportada ao laboratório em meio de transporte[1] em gelo.

Figura 4 – Componentes dentários e polpa coletada



[1] Meio de transporte: α-MEM ("α-Modified Minimal Essential Medium", 11900-073, Gibco, suplementado com 2 mM de glutamina) + 100 µg /mL ampicilina (A0166, Sigma-Aldrich), 100 µg/mL de estreptomicina (11860-038, Gibco).

As DPSCs foram isoladas segundo o protocolo adaptado de Gronthos e colaboradores (Gronthos 2000, 2011). Inicialmente, as polpas foram desagregadas mecanicamente e enzimaticamente com uma solução de Colagenase tipo I - 6 mg/mL (17100-017, Gibco) e Dispase - 8 mg/mL (17105041, Gibco) por 1 h à 37 °C em banho-maria e agitação em vórtex a cada 15 min. Após este período, a remoção destas enzimas foi realizada por centrifugação. O *pellet* celular formado foi lavado com solução salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA) e, novamente, centrifugado a 800 rpm por 5 min. Este, então, foi ressuspendido em meio clonogênico[2] e filtrado em filtro de 70 µm (BD Biosciences) para obtenção de "single cells". As células isoladas foram cultivadas por 14-15 dias, até a primeira tripsinização (passagem 1 – #P1), e expandidas na proporção 1:3 até a passagem 4 (#P4) para a caracterização e até a passagem 5 (#P5) para os experimentos. Em cada passagem, uma fração das células foi congelada em meio de congelamento[3] para estoque em nitrogênio líquido. Estas foram mantidas em uma atmosfera de 5% CO_2 e à 37 °C. A análise da morfologia celular foi realizada e a captura da imagem em microscópio óptico invertido com contraste de fase.

Para os experimentos, foram utilizadas células isoladas de 3 pacientes diferentes, designados como paciente 1, 2 e 3 (Quadro 2).

Quadro 2 – Dados dos doadores das DPSCs utilizadas neste trabalho

Paciente	Idade	Gênero	Dente extraído	Nível de erupção	Risogênese
1	15 anos	Feminino	3°Molar	Incluso	Incompleta
2	21 anos	Masculino	3°Molar	Incluso	Completa
3	23 anos	Feminino	3°Molar	Erupcionado	Completa

4.2 Caracterização das DPSCs

A caracterização foi realizada segundo os parâmetros estabelecidos pela "Internacional Society for Cell Therapy" (Dominici et al 2006), onde as células-tronco

[2] Meio clonogênico: α-MEM suplementado com 2 mM de glutamina + 10% SFB ("Fetal Bovine Serum", F2561, Sigma-Aldrich e 015/15, Vitrocell) + 50 µg/mL ácido ascórbico (A8960, Sigma-Aldrich), 100 µg /mL ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina.

[3] Meio de congelamento: 10% de α-MEM suplementado com 2 mM de glutamina + 80% SFB + 10% DMSO ("Dimetilsulfóxido", C6164, Sigma-Aldrich).

mesenquimais devem expressar determinados marcadores de superfície celular, ser aderentes ao plástico e ter potencial de multi-diferenciação em linhagens mesenquimais (ao menos osteoblastos, adipócitos e condrócitos).

4.2.1 Imunofenotipagem

Os marcadores de superfície celular foram analisados por citometria de fluxo multiparamétrica (equipamento FACSÁria II SORP /"Fluorescente activated cell sorting", BD). As células na #P4 foram desagregadas em solução de Versene[4] por 30 min à temperatura ambiente, sob agitação, e, posteriormente, as células desagregadas foram centrifugadas a 400 x *g*, por 10 min, temperatura ambiente. O *pellet* celular foi, fixado em paraformaldeído 4% (P6148, Sigma-Aldrich) e incubado em Solução de Bloqueio (5% BSA, 0,01% TRITON X em PBSA). Após este período, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e, para cada tubo, foram utilizadas 1 x 10^6 células (Figura 5).

Foram utilizados como marcadores positivos a STRO-1, CD90, CD105, CD45, CD29, CD44, CD146, como marcadores negativos o CD34, CD14, CD31, CD15, CD73 e como controle isotípico, IgG1 (Quadro 3). Utilizou-se também tubos de compensação (com fluorescências positivas para os fluoróforos empregados) e a análise foi feita no *software* FloWJo.

4.2.2 Curva de proliferação

As células foram semeadas em placas de multipoços P24 (1 x 10^4 células/poço) em triplicata. Após 24 hs (primeiro ponto – dia 1), as células foram coradas com Trypan Blue 0,4% (T6146, Sigma-Aldrich) e contadas em Câmara de Neubauer por 7 dias consecutivos para a obtenção da curva de proliferação.

4.2.2.1 Tempo de dobramento populacional

Os dados da contagem celular foram utilizados para obter o cálculo do tempo de dobramento populacional (TD) calculado usando um algoritmo disponível *on-line*

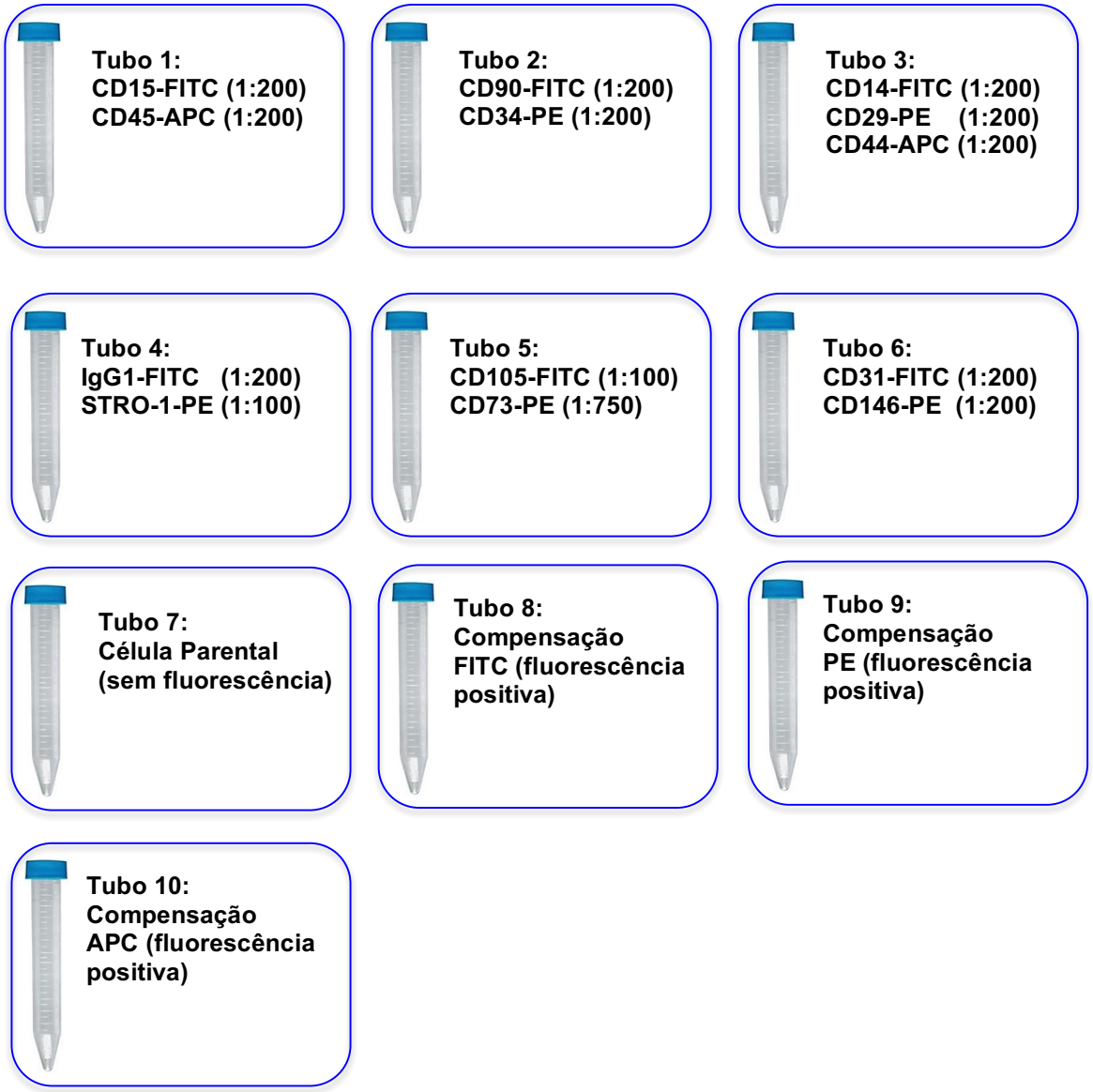
[4] Solução de versene: EDTA 50 mM (E3889, Sigma-Aldrich), em PBSA, pH 8,0.

(http://www.doubling-time.com/compute.php) (Roth 2006):

$$TD = \frac{t \times \log(2)}{\log(N_f) - \log(N_0)}$$

Onde "log" é o logaritmo na base 10 ou 2 ou qualquer outra base, N_0 é o número de células inicial, N_f é o número de células final e “t” é a duração da cultura em horas.

Figura 5 – Estratégia dos tubos com os marcadores usados para a imunofenotipagem



Quadro 3 – Descrição dos anticorpos utilizados na Imunofenotipagem

Anticorpo	Marca	Código	Diluição	Fluoróforo Conjugado	Anticorpo Secundário	Tipo Celular	Função
STRO-1	Abcam	ab102969	1:100	PE	Anti-mouse PE	MSC	Melhor marcador de MSCs
CD90 (Thy-1)	BD	561969	1:200	FITC	Anti-mouse FITC	MSC, timócitos e neurônios	Ancorada via GPI e marcadora de diversas células-tronco
CD105 (endoglina)	Abcam	ab18278	1:100	FITC	-	MSC e células endoteliais	Glicoproteína que é um receptor para TGF-β e modula sua interação com os seus receptores (TGF-βRI e TGF-βII)
CD45	BD	340942	1:200	APC	-	Exclusivo de células da linhagem hematopoiética	Mais abundante glicoproteína em leucócitos e é um receptor ligado a proteínas tirosino fosfatase
CD29 (integrina β1)	BD	555443	1:200	PE	-	MSC	Integrina mais abundante e conecta a actina do citoesqueleto a MEC e envolvida na embriogênese e reparo tecidual
CD44	Dako	M7082	1:200	APC	-	HSC, MSC	Molécula de adesão celular
CD34	BD	550761	1:200	PE	-	Progenitores de HSC	Glicoproteína com função de molécula de adesão, mediando a interação de HSC a MEC ou ao estroma
CD14	BD	347493	1:200	FITC	-	Células de defesa	Ancorada via GPI e componente do sistema imune inato
CD31 (PECAM-1)	BD	555445	1:200	FITC	-	Células endoteliais, plaquetas, monócitos e neutrófilos	Família das imunoglobulinas e marcador de angiogênese
CD15 (SSEA-1)	BD	560997	1:200	FITC	-	Células em estágios iniciais de diferenciação	Carboidrato expresso em glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanas
CD73	Abcam	ab54217	1:750	PE	Anti-mouse PE	Diferenciação de linfócitos	Enzima envolvida na diferenciação linfocitária e células endoteliais
CD146 (MUC18)	Novus	NBP1-43346	1:200	PE	Anti-mouse PE	Células endoteliais	Glicoprotéina
IgG1	BD	340755	1:200	FITC	-	Controle isotípico	Imunoglobulina

APC: *allophycocyanin*; ECC: células de carcinoma embrionário; ESC: células-tronco embrionárias; FITC: *fluorescein isothiocyanate*; GPI: glicosilfosfatidilinositol; HSC: células-tronco hematopoiéticas; MEC: matriz extracelular; MSC: células-tronco mesenquimais; PE: *phycoerythrin;* TGF: fator de crescimento transformante.

4.2.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

As células foram semeadas em placas de multipoços P24 (6.250 céls/cm^2/poço) em triplicata. Após 48 hs (primeiro ponto – dia 1), as células foram analisadas por 3 dias consecutivos. Cada poço foi incubado com MTT ("Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide", M5655, Sigma-Aldrich), concentração final de 50 µg/mL por poço durante 4 hs à 37 °C. Para extrair o produto da reação com o MTT, o formazan (coloração azul), foi utilizado álcool etílico por 20 min sob agitação e a leitura foi realizada em espectofotômetro à 570 nm (Synergi 2 microplate reader, Biotek).

4.2.4 Ensaio de senescência

O ensaio mais aceito para senescência celular é a atividade da β-galactosidase ácida. Não existe uma explicação porque esta enzima aumenta nos lisossomas durante a senescência, mas apesar desta falta de entendimento ela é aceita como um marcador do estado senescente.

As células foram semeadas em lâminas Labtek® (1 x 10^3 células/poço). Após 24 hs os pocinhos foram lavados com PBSA, fixados com formaldeído 3-5% (1643, Dinâmica) em PBSA por 15 min e incubados com a solução de marcação da β-galactosidase[5] à 37 ºC durante 16 hs. Células senescentes ficam azuis, além de normalmente possuírem uma forma mais achatada. A análise foi feita contando as células azuis e dividindo este valor pelo número de células totais no campo em microscópio óptico invertido com contraste de fase.

4.2.5 Ensaio de formação de colônia

As células foram semeadas em placas de multipoços P6 (50 células/cm^2/poço e 210 células/cm^2/poço) em triplicata. Após 10 dias em cultura, cada poço foi

[5] Solução de marcação da β-galactosidase: 1 mg/mL de X-gal ("5-bromo-4-chloro-3 indolyl–galactopiranoside", B9146, Sigma-Aldrich), 40 mM de ácido cítrico 80mM/tampão fosfato 100mM (pH 6,0) (C8532, Sigma-Aldrich; F1034401AH, Synth; F103301AH, Synth), 150 mM NaCl (C1060.01AH, Synth), 2mM $MgCl_2$ (C1016, Sigma-Aldrich), 5 mM Ferrocianeto de Potássio (P3289, Sigma-Aldrich), 5 mM Ferricianeto de Potássio (244023, Sigma-Aldrich).

incubado com a solução de cristal violeta 0,5% (1.159.40.0025, Certistain®, Merck) e glutaraldeído 6% (383, Vetec) por 30 min sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi cuidadosamente submergida em um becker com água, para remoção da marcação inespecífica do corante e secagem em temperatura ambiente. A análise e a captura da imagem foram realizadas em microscópio óptico invertido (Observer D1, Zeiss).

4.2.6 Indução da diferenciação adipogênica

As células foram semeadas em placas P35 (5.000 células/cm^2). A indução da diferenciação foi realizada pelo meio adipogênico[6] por 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A validação da diferenciação adipogênica foi realizada pela coloração específica, onde as vesículas lipídicas intracelulares se coram em vermelho. As placas foram lavadas com PBSA, fixadas com 1:10 formaldeído 37% em PBSA por 30 min à temperatura ambiente e incubadas com solução de Oil Red O (O0625, Sigma-Aldrich) por 20 min, sob agitação em temperatura ambiente. A análise e a captura da imagem foram realizadas em microscópio óptico invertido.

4.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Em placas de multipoços P96 foram colocadas lamínulas Thermanox® Plastic Coverslips (174950, NUNC Brand Products) cortadas com tesoura estéril para se adaptar ao tamanho do poço e, então, as células foram semeadas (5000 células/cm^2) e coletadas 48 hs depois. Retirou-se o meio de cultura dos poços, em seguida, eles foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M, fixados com a solução Karnovsky modificada por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% por 1 h à temperatura ambiente e a desidratação (soluções com crescente concentração de álcool, a partir de 30% até 100%), por 5 min cada e no óxido de propileno (20401, Eletron

[6] Meio adipogênico: α-MEM suplementado com 2 mM de glutamina + 10% SFB + 100 nM dexametasona (D2915, Sigma-Aldrich) + 5 µg/mL insulina (I1882, Sigma-Aldrich)+ 200 µM indometacina (I7378, Sigma-Aldrich) + 100 µg/mL IBMX (I7018, Sigma-Aldrich) + 100 U/mL ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina.

Microscopy Sciences) por 3 vezes de 10 min cada. Iniciou-se a infiltração, com resina Spurr (14300, Electron Microscopy Sciences) e óxido de propileno na proporção 1:1 por 40 min, em seguida com resina Spurr e óxido de propileno na proporção 3:1 e, finalmente, com resina Spurr pura *overnight*. O material foi incluído em resina Spurr e mantido por 3 dias em estufa a 60 ºC. Cortes espessos foram realizados para a localização da área de interesse com o uso de faca de vidro e ultramicrótomo (Ultra-Cut Reichert). Cortes ultra-finos foram obtidos com a faca de diamante, coletados em telas de 200 "mesh" e posteriormente contrastados com solução de acetato de uranila 4% (22400, Electron Microscopy Sciences) e citrato de chumbo a 0,4% (R-1030, Herzog e 2322, JT Baker).

As imagens foram analisadas e capturadas no microscópio eletrônico de transmissão (JSM-1010, JEOL) do Centro de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

4.3 Osteogênese *in vitro*

A indução da diferenciação foi realizada pelo meio osteogênico[7] e o controle negativo da diferenciação osteogênica por meio clonogênico por 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Em todos os experimentos, para análises bioquímicas e moleculares, as células foram semeadas na densidade de 5.000 células/cm^2

4.3.1 Quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP)

As células foram semeadas em placas de multipoços P12 (5.000 células/cm^2) em triplicata. As placas foram lavadas com PBSA, as células foram lisadas com tampão de lise ALP[8], centrifugadas por 15 min, 12.000 x *g* à 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80 °C. A quantificação foi feita pelo kit Ensaio de Ponto Final – Fosfatase Alcalina (40, Labtest). As amostras foram incubadas (5 µL da amostra) com 50 µL do tampão de reação (kit) e 5 µL da solução contendo o

[7] Meio osteogênico: α-MEM + 10% SFB + 1 µM dexametasona (D2915, Sigma Aldrich) + 10 mM β-glicerofosfato + 50 µg/mL ácido ascórbico + 100 U/mL ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina.

[8] Tampão de lise ALP: Tris a 0,5 M – pH 9,0; 0,9% NaCl e 1% Triton X-100.

substrato (kit), durante 5 min à 37 °C. Em seguida, foi adicionado 200 µL do reagente de cor (kit) e a leitura foi realizada à 590 nm em espectrofotômetro.

4.3.2 Coloração por alizarina vermelha

As células foram semeadas em placas P35 (5.000 células/cm^2). As placas foram lavadas com PBSA, fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min à temperatura ambiente e incubadas com uma solução de Alizarina Vermelha 2% (pH 4,2) (A5533, Sigma-Aldrich) por 30 min, sob agitação em temperatura ambiente. A análise e a captura das imagens foram realizadas em microscópio óptico invertido.

4.3.3 Perfil de expressão gênica (PCR em tempo real)

A quantificação dos níveis de transcritos do colágeno tipo I (Col I), MMPs, TIMPs e RECK foi realizada por PCR em tempo real.

4.3.3.1 Extração do RNA total, transcrição reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real (qRT-PCR)

As células foram semeadas em placas P100 (5.000 células/cm^2). As amostras foram coletas e lisadas em 1 mL do reagente TRIzol (15596-026, Life Technologies). Inicialmente, elas foram homogeneizadas e incubadas por 5 min à temperatura ambiente; adicionou-se 200 µL de clorofórmio (1534-1, Dinâmica) e o tubo foi vortaxado vigorosamente por 15 seg; a amostra foi incubada por 3 min à temperatura ambiente e centrifugada por 15 min a 12.000 x *g* à 4 °C (5804R, Eppendorf). A amostra centrifugada apresentou 3 frações diferentes, a fração aquosa (superior) contendo o RNA foi coletada e armazenada em outro tubo. Ao novo tubo foi adicionado 500 µL de isopropanol (1339, Dinâmica) que foi agitado por inversão durante 1 min, incubado por 30 min no gelo e centrifugado por 10 min a 12.000 x *g* à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se o *pellet* secar com o tubo invertido dentro da capela de exaustão de gases, sob papel filtro. Adicionou-se 1 mL de etanol 75% gelado (em H_2O DEPC –"diethylpyrocarbonate" – Pirocarbonato de dietila, 40718, Sigma-Aldrich), o tubo foi agitado 3 vezes por inversão e centrifugado por 5 min a 12.000 x *g* à 4 °C; o sobrenadante foi desprezado e deixou-

se o *pellet* secar com o tubo invertido dentro da capela de exaustão de gases, sob papel filtro.

O RNA purificado foi ressuspendido em 50 µL de água DEPC. O mRNA purificado foi armazenado à -80 °C em biofreezer. Uma alíquota de cada amostra foi quantificada em Nanodrop (2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Em seguida, o RNA total (1 µg ou 500 ng) foi tratado com 1 µL de DNAse I (18068-015, Invitrogen), 1 µL de tampão e H_2O DEPC para um volume final de 10 µL. Deixou-se 15 min à temperatura ambiente e 10 min à 65 °C. Para a inativação da enzima, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM). Na seqüência, os DNAs complementares foram sintetizados por RT-PCR (18080-093, SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen). A RT-PCR foi realizada em duas etapas: (I) alinhamento (65 °C por 5 min): para um volume final de 13 µL, foi adicionado 11 µL de RNA tratado com DNase I, 1 µL de oligo(dT) (18418-012, Invitrogen) e 1 µL de dNTP 10 mM (dATP 2,5 mM, dCTP 2,5 mM, dGTP 2,5 mM e dTTP 2,5 mM) (100 mM dNTP Set, PCR grade, 10297-018 Invitrogen); (II) transcrição reversa (50 °C por 60 min e 70 °C por 15 min): após o alinhamento, adicionou-se 4 µL de Tampão 5 X, 1 µL de DTT (0,1M), 1 µL de RNaseOUT™ (40U/µL) (10777-019, Invitrogen) e 1 µL de SuperScript (200 U/µL), para um volume final de 20 µL. Ao término da segunda etapa, o cDNA foi obtido.

O cDNA sintetizado foi o molde utilizado para a reação pelo método do SYBR Green Dye I e para a avaliação da expressão gênica relativa pelo método de Pfaffl (2001), segundo o cálculo:

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

O GAPDH, a Tubulina e a β-actina foram utilizados como genes endógenos para a normalização das amostras. As amostras calibradoras foram as DPSCs na #P4 (célula parental). As amostras sintetizadas a partir de 1 µg de RNA foram diluídas 1:1 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 pM de cada primer (400 nM), 5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems) e água q.s.p. As reações foram realizadas no equipamento da

Applied Biosystems (7500, Real-Time PCR System), à 60 °C em 40 ciclos. Os *primers* foram desenhados inter-éxon no software GeneTool 2.0, selecionados no banco de dados público de sequências *primers* para PCR (PrimerBank, https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/*)* ou a partir de sequências já publicadas da literatura e, em seguida, verificada a especificidade dos mesmos pela ferramenta *on-line* BLAST (Quadro 4).

4.3.3.2 Análise do melhor gene endógeno

Para verificar o gene endógeno mais estável dentro do grupo amostral, foi utilizado o *software on-line* Normfinder (Andersen et al., 2004). O programa utiliza como estratégia um modelo matemático para a expressão dos genes, que permite estimar não só a variação global dos genes candidatos, como também a variação da normalização entre os subgrupos da amostra do conjunto de amostras. Os valores da Eficiência $^{\Delta Ct \text{ normalizador } (\Delta Ct \text{ calibradora} - \Delta ct \text{ amostra})}$ das amostras para cada ponto de coleta foram utilizados para os genes GAPDH, Tubulina e β-actina. O gene da β-actina mostrou-se como o melhor gene endógeno (Quadros 5 e 6), sendo utilizado como gene endógeno para a normalização dos resultados.

4.3.4 Perfil de expressão protéica (western blotting)

4.3.4.1 Coleta, extração e quantificação de proteína total

As células foram semeadas em placas P60 (5.000 células/cm^2). As amostras foram tripsinizadas, centrifugadas a 800 rpm por 5 min, o *pellet* foi lavado 3 vezes com PBSA gelado e o *pellet* seco foi congelado à -80 °C até o momento da extração de proteína total. Os *pellets* foram ressuspendidos em 300 µL de tampão de lise proteína[9].

[9] Tampão de lise proteína: Tris-HCl 50mM (15504-020, Invitrogen), Tween 20 1% (P9416, Sigma-Aldrich), deoxicolato de sódio 0,25% (D6750, Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM (S7653, Sigma-Aldrich), EDTA 1mM (E3889, Sigma-Aldrich), ortovanadato de sódio 1 mM (S6508, Sigma-Aldrich), fluoreto de sódio 1 mM (201154, Sigma-Aldrich), aprotinina 1,0 µg/mL (A6106, Sigma-Aldrich), leupeptina 10 µg/mL (L2023, Sigma-Aldrich) e Pefabloc 1mM (76307, Sigma-Aldrich), pH 7,4.

Quadro 4 – Sequências dos primers utilizados e tamanho do fragmento amplificado (amplicon).

Gene-Alvo	Número de Acesso (Pubmed)	Sequência dos primers (5´- 3´)	Temperatura de Anelamento (ºC)	Amplicon (pb)
MMP-1**	NM_002421	F: acacgccagatttgccaaga R: cgatgatctcccctgacaaa	60	145
MMP-2**	NM_004530	F: ccctcgcaagcccaagtg R: ggattcgagaaaaccgcagt	60	149
MMP-3**	NM_002422	F: ttgctcagcctatccattgg R: ccactgtcctttctcctaac	60	132
MMP-7**	NM_002423	F: gcgttcatcctcatcgaagt R: tgtatggggaactgctgaca	62	151
MMP-9**	NM_004994	F: cagcgccagtccaccctt R: cccgagtgtaaccatagcg	60	103
MMP-10**	NM_002425	F: gcccagcaatacctagaaaag R: cctccagagtgtcagtgtc	60	154
MMP-13**	NM_002427	F: gcgctacctgagatcatact R: tcgtcaagtttgccagtcac	60	135
MMP-14*	NM_004995	F: gcagaagttttacggcttgca R: tcgaacattggccttgatctc	60	100
MMP-15**	NM_002428	F: cgggaggaagtggaacaac R: cagcccaacttctccgtgt	60	66
MMP-16**	NM_005941	F: ggacagaaatggcagcacaa R: cggcgaatagctttacgagt	60	92
MMP-17**	NM_016155	F: caccggcatcctggacga R: gggagcagcgtggggttt	60	56
MMP-25**	NM_022468	F: agcggcagcgtgtggaag R: ccgcacggtctcctggct	60	87
MMP-28**	NM_024302	F: ccccaaagctcccacctc R: gcagcggggacgagtcat	60	124
TIMP-1**	NM_003254	F: ttaggggatgccgctgac R: caggtagtgatgtgcaagag	60	143
TIMP-2**	NM_003255	F: aggaagtggactctggaaac R: gggggccgtgtagataaac	60	122
TIMP-3**	NM_000362	F: ttcggcacgctggtctaca R: ttggtgaagcctcggtacat	60	56

TIMP-4**	NM_003256	F: tcggcacttgtgattcggg R: gcatttttcagtgtcagcag	60	82
RECK*	NM_021111	F: tgcaagcaggcatcttcaaa R: accgagcccatttcatttctg	60	100
GAPDH**	NM_002046	F: gcatcctgggctacactga R: ccaccaccctgttgctgta	60	162
β-actina**	NM_001101	F: cgacaggatgcagaaggag R: tcctgcttgctgatccacat	60	153
Tubulina**	NM_001293212.1	F: tcaacaccttcttcagtgaaacg R: agtgccagtgcgaacttcatc	60	151
Col I***	NM_001844	F: gagcggtaacaagggtgagc R: cttccccattagggcctctc	60	186

* Primers sintetizados a partir de Figueira et al 2009; ** Primers desenhados pelo GeneTool; *** Primers sintetizados a partir de sequências do PrimerBank

Quadro 5 – Variação da normalização global dos genes endógenos candidatos

Paciente	Valor de estabilidade			Melhor gene	Melhor combinação de dois genes	Valor de estabilidade para a melhor combinação de dois genes
	GAPDH	Tubulina	β-actina			
1	0,909	0,594	0,410	β-actina	GAPDH and β-actina	0,429
2	0,691	0,305	0,270	β-actina	β-actina and Tubulina	0,356
3	0,294	0,310	0,129	β-actina	GAPDH and β-actina	0,160

Quadro 6 – Variação da normalização entre os grupos da amostra

Paciente	VARIAÇÃO INTRAGRUPO			VARIAÇÃO INTERGRUPO		
	Gene	Grupo 1	Grupo 2	Gene	Grupo 1	Grupo 2
1	GAPDH	3,300	0,611	GAPDH	-0,521	0,521
	β-actina	0,055	0,146	β-actina	0,249	-0,249
	Tubulina	0,434	0,609	Tubulina	0,272	-0,272
2	GAPDH	1,135	3,878	GAPDH	0,356	-0,356
	β-actina	0,026	0,013	β-actina	-0,207	-0,207
	Tubulina	0,162	0,214	Tubulina	-0,148	0,148
3	GAPDH	0,147	1,112	GAPDH	-0,191	0,191
	β-actina	0,033	0,204	β-actina	0,051	-0,051
	Tubulina	0,189	1,172	Tubulina	0,140	-0,140

Os lisados foram sonicados (SX-10, Microsonic) em tubos cônicos (10 pulsos cada), incubados em gelo por 2 hs e centrifugados a 14.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi preservado e armazenado à -20 ºC.

Para a dosagem de proteína total foi usado o Kit BCA ("Pierce BCA Protein Assay Kit", 23225, Thermo Scientific). O kit contém dois reagentes (A e B). Foram pipetados 200 µL da mistura contendo os reagentes A e B, na proporção 50:1, respectivamente, em uma P96. Em seguida, foi adicionado 25 µL da amostra ou do padrão nos respectivos poços. A placa foi incubada por 30 min à 37 °C e a leitura foi feita à 562 nm em espectrofotômetro (Synergi 2 microplate reader, Biotek). As concentrações (µg/µL) das amostras foram obtidas com base na curva padrão de BSA.

4.3.4.2 Preparo das amostras e preparo do gel

Foram utilizados 10 µg de proteína por linha e, para isso, adicionou-se igual volume de tampão de amostra 2 X[10] ao volume da amostra que foi colocada em cada linha. As amostras foram desnaturadas à 95 ºC por 5 min. Foram utilizados géis de resolução ("resolving gel")[11] de 8% a 15% de acordo com o tamanho das proteínas a serem resolvidas. Já o gel de empacotamento ("stacking gel")[12] foi de 3,9%.

4.3.4.3 Eletroforese

A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em cuba vertical (Amersham) com tampão de corrida 1 X[13] de 2-3 hs à 100-150 V e 30 mA . As amostras foram colocadas nas

---

[10] Tampão de amostra 2 X: Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, glicerol 20%, DTT 200 mM.

[11] Gel de resolução: Tris-HCl 1,5 mM, pH 8,8, solução de poliacrilamida 30%, persulfato de amônio 10% (A3678, Sigma-Aldrich), TEMED (T9281, Sigma-Aldrich), SDS 10% (15525-017, Invitrogen), H_2O q.s.p.

[12] Gel de empacotamento: Tris-HCl 1 mM, pH 6,8, solução de poliacrilamida 30%, persulfato de amônio 10%, TEMED, SDS 10%, H_2O q.s.p.

[13] Tampão de corrida 1 X: Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 1%.

linhas do gel de empacotamento as quais migrarão até o gel de resolução para a separação das proteínas pelo peso molecular (kDa) (Quadro 7).

4.3.4.4 Imunobloting e revelação da membrana

Após a corrida, as proteínas foram transferidas com tampão de transferência 1 X[14] para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, RPN303D, Amersham) por 2 hs, à 100 V, 300 mA, 4 ºC. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi confirmada pela coloração das proteínas da membrana pelo corante vermelho Ponceau (P3504, Sigma-Aldrich). Após a transferência, a membrana foi bloqueada por incubação com leite desnatado 5% em tampão TBST[15] à temperatura ambiente por 1 h, sob agitação. Os anticorpos primários foram incubados *overnight* à 4 ºC (Quadro 7) e o anticorpo secundário à temperatura ambiente por 1 h, ambos sob agitação e em leite desnatado 5% em tampão TBST. Entre as incubações, a membrana foi lavada 3 X (15 min cada) com TBST, sob agitação.

Como anticorpos secundários foram utilizados: (I) anti-rabbit IgG-HP (HAF008, R&D Systems); (II) anti-mouse IgG-HP (HAF007, R&D Systems); e (III) anti-goat IgGHP (NB120-5755, Novus Biologicals), para os anticorpos primários produzidos em rabbit, goat e mouse, e nas diluições de 1:1.000, 1:5.000 e 1:1.000, respectivamente. Como controle endógeno, foi utilizada a proteína actina.

A revelação da membrana foi realizada por quimioluminescência, pelo kit ECL Plus (RPN2132, Amersham), a membrana foi escaneada no aparelho Storm 860 (Molecular Dynamics) (Pixel size: 100 µm, PMT voltage: 800) e a imagem foi gerada pelo programa Image Quant. Foi utilizado como marcador de peso molecular o Rainbow (RPN800E, Amersham), o qual apresenta bandas coloridas referentes a pesos moleculares definidos durante a corrida.

---

[14] Tampão de transferência 1 X: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, metanol 20%, pH 8,3

[15] Tampão TBST: Tampão TBS adicionado 0,05% de Tween 20.

Quadro 7 – Especificações dos anticorpos e peso molecular utilizados para western blot e imunofluorescência

Anticorpo Primário	Animal Hospedeiro	Empresa	Código	Peso Molecular (kDa)	Diluição utilizada para Western Blot	Diluição utilizada para Imunofluorescência
MMP-1	Rabbit	Abcam	ab52631	54	1:1000	1:50
MMP-2	Rabbit	Abcam	ab37150	76 (pró)/66 (ativa)	1:1000	1:50
MMP-3	Rabbit	Abcam	ab52915	50	1:1000	1:50
MMP-7	Rabbit	Novus Biologicals	NB600-1153	28	1:1000	1:25
MMP-9	Rabbit	Abcam	ab76003	92 (pró)/86 (ativa)	1:500	1:100
MMP-10	Rabbit	Novus Biologicals	NB100-92182	54	1:1000	1:50
MMP-13	Rabbit	Abcam	ab39012	54	1:1000	1:200
MMP-14/MT1-MMP	Rabbit	Novus Biologicals	NB110-57216	66 (pró)/56 (ativa)	1:1000	1:50
MMP-15/MT2-MMP	Rabbit	Novus Biologicals	NB600-1486	76	1:200	1:50
MMP-16/MT3-MMP	Rabbit	Abcam	Ab73877	57	1:200	1:100
MMP-17/MT4-MMP	Rabbit	BioVision	3537-100	62	1:100	1:50
MMP-24/MT5-MMP	Rabbit	Biovision		58	1:200	1:50
MMP-25/MT6-MMP	Rabbit	Abcam	ab39032	65	1:200	1:50
MMP-28	Rabbit	Abcam	ab11791	62/58	1:1000	1:50
TIMP-1	Rabbit	Abcam	ab38978	28	1:500	1:50
TIMP-2	Mouse	Calbiochem	IM56	21	1:2000	1:50
TIMP-3	Rabbit	Abcam	ab39185	24	1:500	1:250
TIMP-4	Rabbit	Abcam	ab58425	26	1:500	1:50
RECK	Rabbit	Cell Signaling	3433	100/110	1:1000	1:50
Colágeno tipo I	Rabbit	Calbiochem	234167	139	1:100	1:100
Actina	Rabbit	Thermo	PA1-16890	42	1:5000	-

4.3.4.5 *Normalização dos Resultados*

As bandas obtidas para as proteínas/enzimas avaliadas foram analisadas no *software* ImageJ, onde a área correspondente a cada banda foi selecionada e obtida um valor em pixels e este valor de cada proteína/enzima alvo foi normalizado com o valor obtido para a proteína actina referente ao mesmo período experimental. Assim a razão entre eles determinou se houve aumento ou diminuição da quantidade de proteína detectada e estes valores foram utilizados na confecção dos gráficos.

4.3.5 Imunofluorescência

As células foram semeadas em placas de multipoços P24 (2.500 células/cm^2) e analisadas 6 dias depois. Os poços foram lavados com PBSA, fixados com paraformoldeído 4% e 0,01% TRITON X por 10 min à 37 °C, incubados com solução de bloqueio (BSA 2% em PBSA) por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos primários foram incubados à 4 °C *overnight* (Quadro 7). No segundo dia, o anticorpo secundário fluorescente (diluição 1:1000) foi incubado por 1 h à temperatura ambiente e foi feita a coloração nuclear com DAPI 300 nM ("4',6-diamidino-2-phenylindole", D9542, Sigma-Aldrich) por 10 min à temperatura ambiente. A visualização foi feita em microscópio de fluorescência (Observer D1, Zeiss) com o filtro específico para o fluoróforo utilizado e as imagens foram captadas com a câmera Axio Cam Hc.

4.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Vide protocolo descrito no tópico 4.2.7.

4.4 Análise Estatística dos Resultados

Para a construção dos gráficos e análises estatísticas foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6. As diferenças estatísticas entre os grupos, para os ensaios de curva de proliferação e MTT, foram determinadas através da análise de variância (two-way ANOVA) seguida do *post hoc* de Bonferroni para identificar quais dos

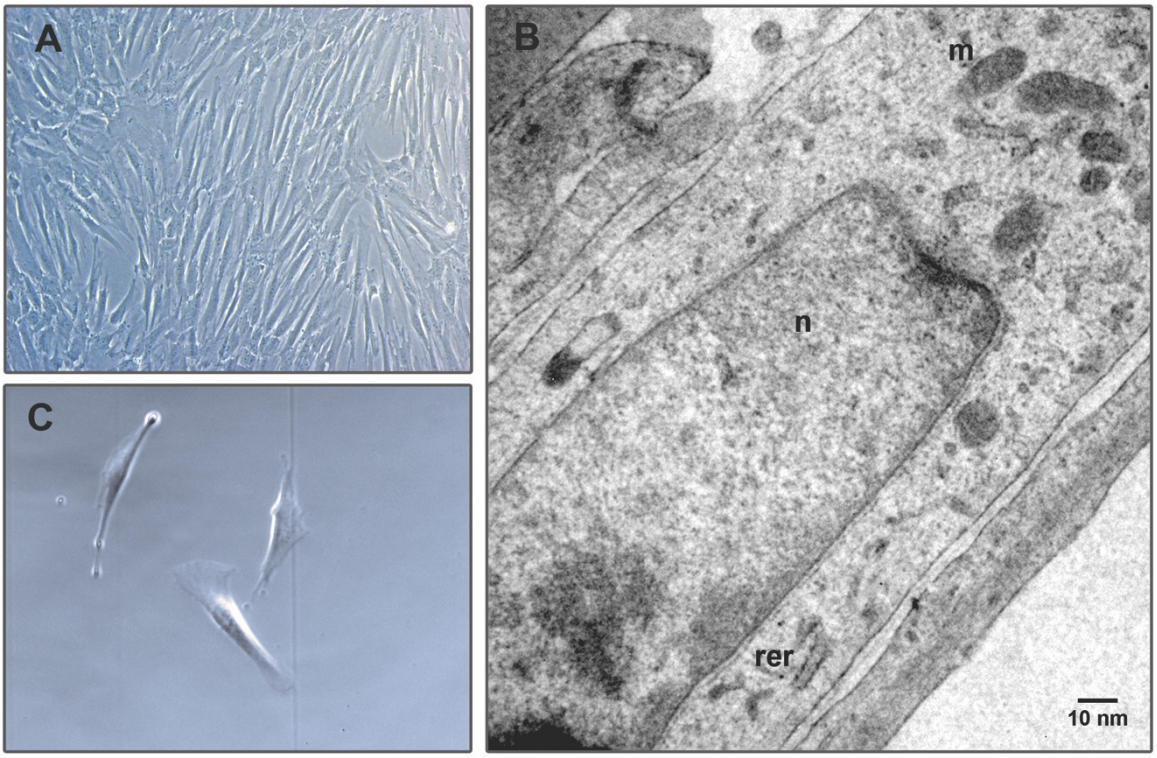
pares de grupos diferem. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, quando $p \leq 0,05$ há significância estatística. A estatística descritiva foi utilizada para os resultados que mostram o perfil de expressão gênica (PCR em tempo real) e perfil de expressão protéica (western blotting).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das DPSCs

Os experimentos de caracterização foram realizados na #P4 para os 3 pacientes. As DPSCs isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide e, quando subconfluentes, se apresentavam de forma mais espraiada e delgada (Figura 6A). Sua ultraestrutura mostrou citoplasma contendo mitocôndrias alongadas e retículo endoplasmático rugoso bem definido bem como morfologia nuclear típica (Figura 6B). Após o ensaio de senescência, não foram identificadas células com coloração azulada, portanto não senescentes (Figura 6C).

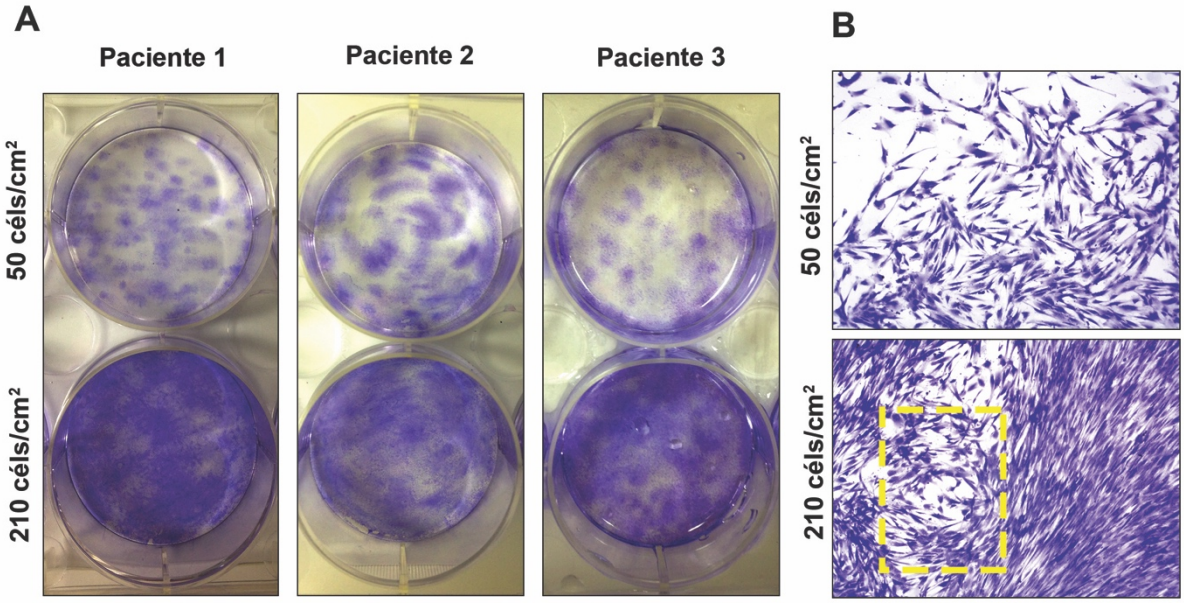
Figura 6 – Caracterização morfológica das DPSCs.



(A) Imagem representativa do aspecto morfológico fibroblastóide das DPSCs cultivadas em meio clonogênico (n=3); (B) Imagem representativa da ultraestrutura por MET (m=mitocôndria, n=núcleo, rer=retículo endoplasmático rugoso); e (C) Ausência de coloração azulada no citoplasma das DPSCs após o ensaio de senescência (n=3). Aumento: 100 x (A), 200 x (C) e 20.000 x (B).

Para o ensaio de formação de colônia, após 10 dias em cultura em baixa densidade (50 céls/cm^2), observou-se a formação de colônias e, na densidade de 210 céls/cm^2, não foi possível definir claramente colônias e sim células em subconfluência (Figura 7A). Microscopicamente, foram observadas morfologia fibroblastóide em ambas as densidades e com a aparência de fusão de colônias (Figura 7B – detalhe em amarelo).

Figura 7 – Ensaio de formação de colônia

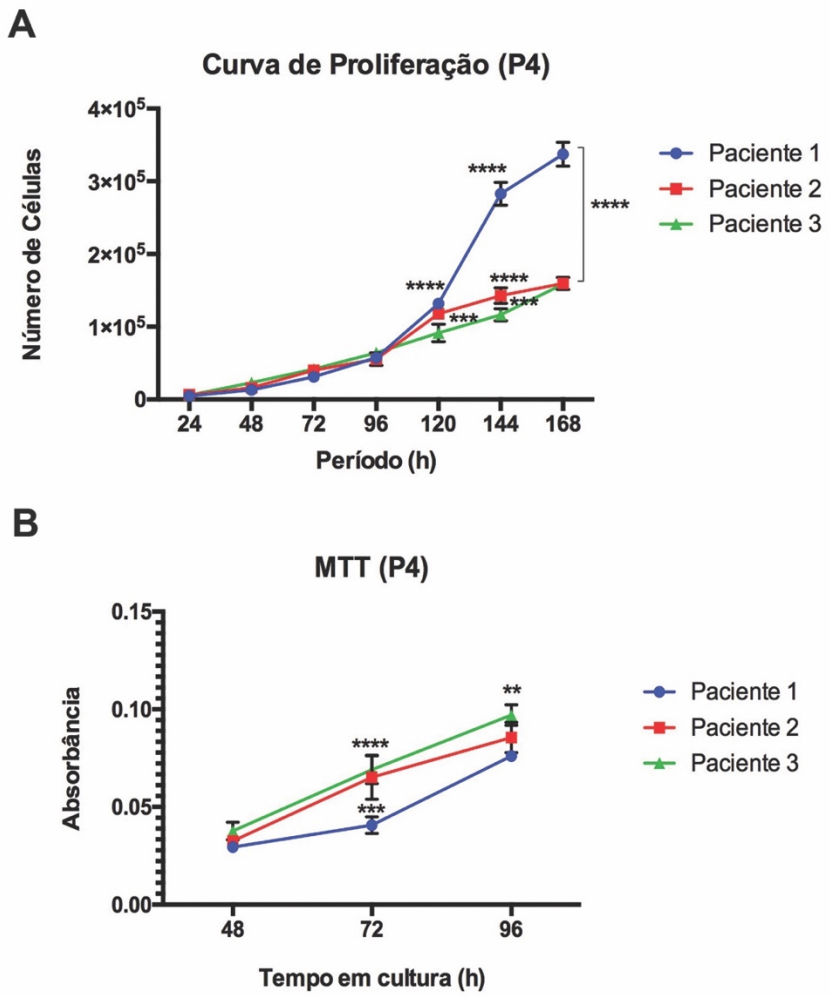


(A) Aspecto macroscópico das DPSCs após 10 dias em cultura celular nas duas densidades celulares avaliadas; (B) Aspecto microscópico representativo das DPSCs. Aumento: 100 x (B).

No ensaio de proliferação celular, a curva de crescimento mostrou-se com aspecto típico de fase exponencial nos períodos iniciais e chegando ao platô nos períodos finais. Após 120 hs, o paciente 1 proliferou mais do que o paciente 3 e o paciente 2 proliferou mais do que o paciente 3. Após 144 hs, o paciente 1 proliferou mais do que os pacientes 2 e 3 e o paciente 2 proliferou mais do que o paciente 3. Após 168 hs, o paciente 1 proliferou mais do que os pacientes 2 e 3 (Figura 8A). O tempo de dobramento (TD) para cada período experimental também foi calculado, sendo que é inversamente proporcional ao crescimento celular. De forma geral, os pacientes 1, 2 e 3 apresentaram TD ≅ 19 hs, ≅ 22 hs e ≅ 25 hs, respectivamente,

refletindo os dados observados para a curva de crescimento. No ensaio de viabilidade celular, apesar do paciente 1 ter apresentado maior proliferação em relação aos outros pacientes, a curva de viabilidade foi a menor. Da mesma maneira, o paciente 3 apresentou a maior curva de viabilidade e o paciente 2 entre eles (Figura 8B).

Figura 8 – Ensaios de proliferação celular e viabilidade

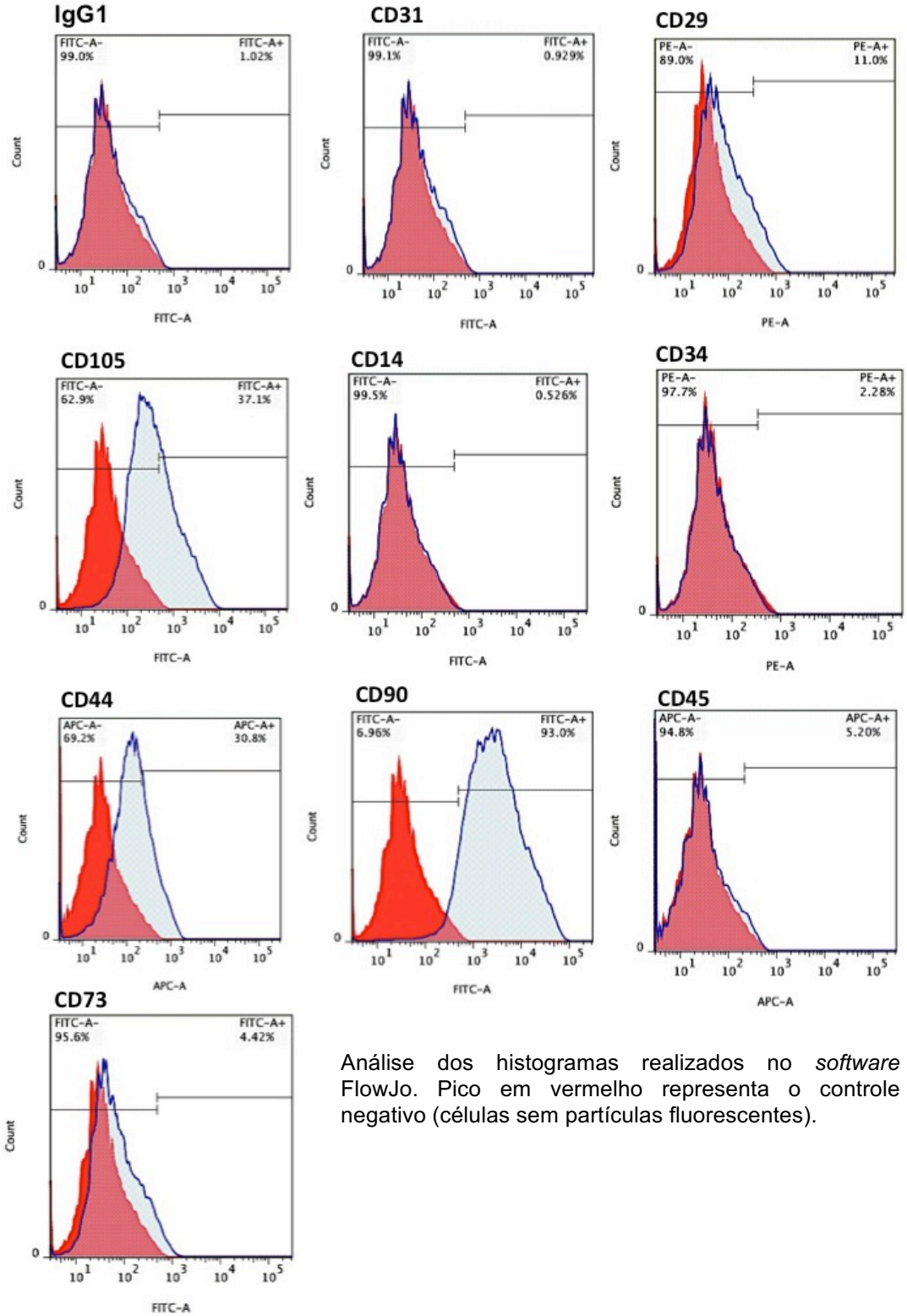


Análise de variância (two-way ANOVA) seguida do *post hoc* de Bonferroni. (A) ***p<0,001 e ****p<0,0001; (B) **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001.

O perfil de marcadores de superfície celular, determinado pela imunofenotipagem, mostrou os seguintes marcadores positivos: CD90 – 93%, CD105 – 37,1%, CD44 – 30,8%, CD29 – 11%, CD73 – 4,43% e como marcadores

negativos: CD45 – 5,2%, CD14 – 0,526%, CD34 – 2,28%, CD31 – 0,929% e o controle isotípico (IgG1 – 1,02%), reforçando que as células isoladas são células-tronco mesenquimais (Figura 9).

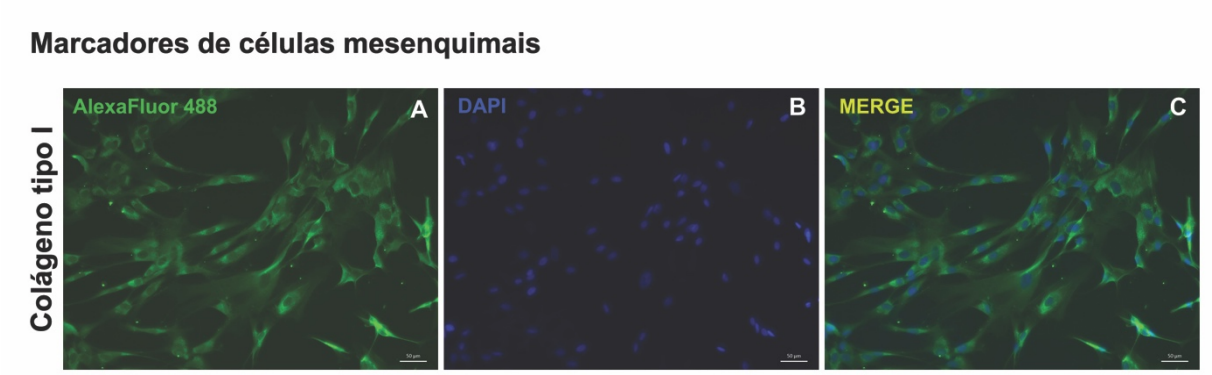
Figura 9 – Imunofenotipagem das DPSCs



Análise dos histogramas realizados no *software* FlowJo. Pico em vermelho representa o controle negativo (células sem partículas fluorescentes).

O colágeno tipo I foi imunolocalizado disperso no citoplasma e, fortemente, no perímetro perinuclear (Figuras 10 A-C).

Figura 10 – Imunofluorescência das DPSCs (Col I)



(A) DPSCs coradas pelo anticorpo colágeno tipo I (fluoróforo verde); (B) núcleos corados por DAPI (fluoróforo azul); e (C) sobreposição de imagens. Aumento: 200 x.

Após a indução da diferenciação adipogênica por 35 dias, foi verificada diferenciação das DPSCs em células tipo adipócito evidenciadas pela coloração vermelha das gotículas lipídicas (Figura 11).

5.2 Avaliação da expressão das MMPs e seus inibidores nas DPSCs

O perfil de expressão da maioria das MMPs e seus inibidores, nas DPSCs isoladas, foi realizado na #P5.

Dentre as colagenases (MMPs -1, -8 e -13), a MMP-1 foi imunolocalizada dispersa no citoplasma e, mais evidente, próximo à membrana celular, provavelmente, no perímetro pericelular (Figuras 12 A-C). A MMP-13 também foi localizada de forma dispersa no citoplasma, porém bem fraca (Figuras 12 D-F). A MMP-8 não foi avaliada.

Dentre as gelatinases (MMPs -2 e -9), a MMP-2 foi imunolocalizada dispersa no citoplasma e no perímetro perinuclear ou núcleo (Figuras 12 G-I). Já a MMP-9 não foi expressa pelas DPSCs.

Figura 11 – Coloração por Oil Red

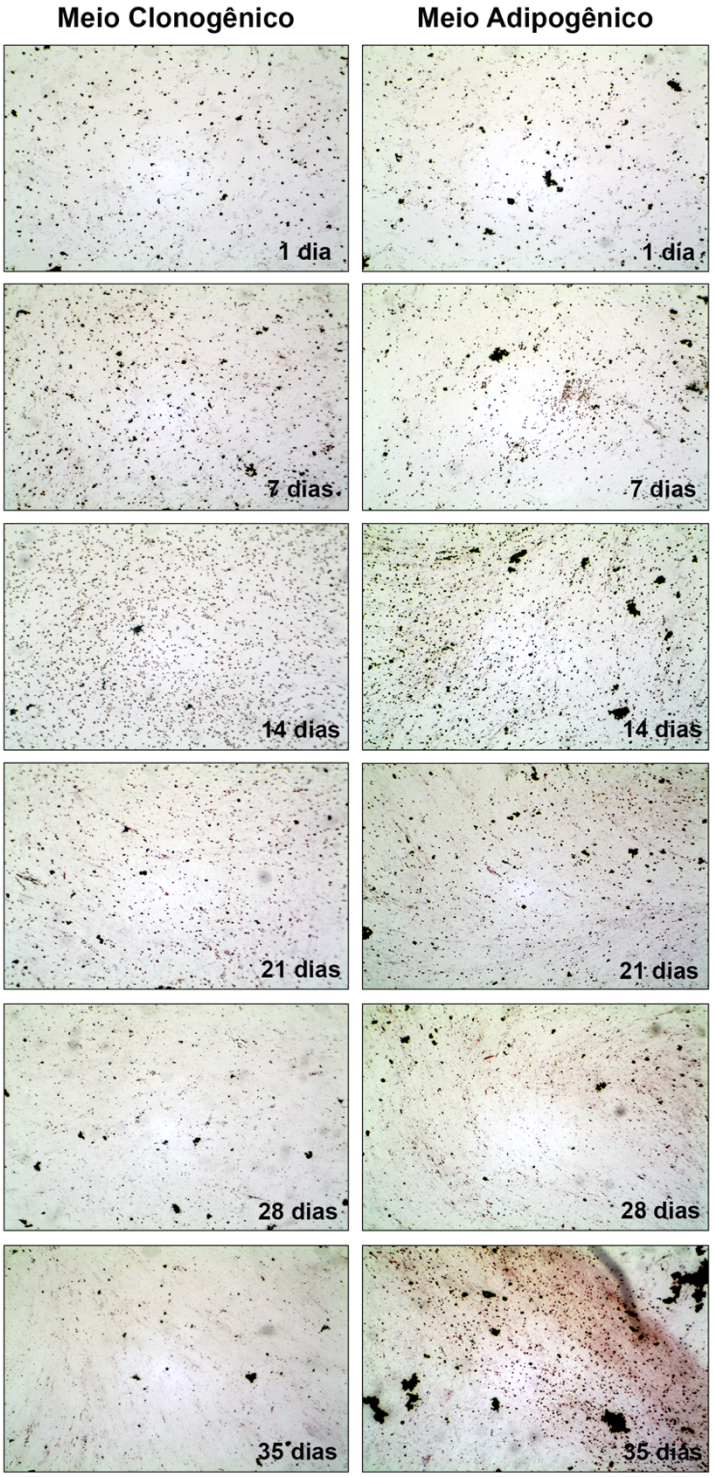


Imagem microscópica representativa da coloração de oil red após a indução da diferenciação adipogênica *in vitro* por 35 dias (n=3). Aumento: 40 x.

Figura 12 – Imunofluorescência das DPSCs (colagenases, gelatinases e matrilisinas)

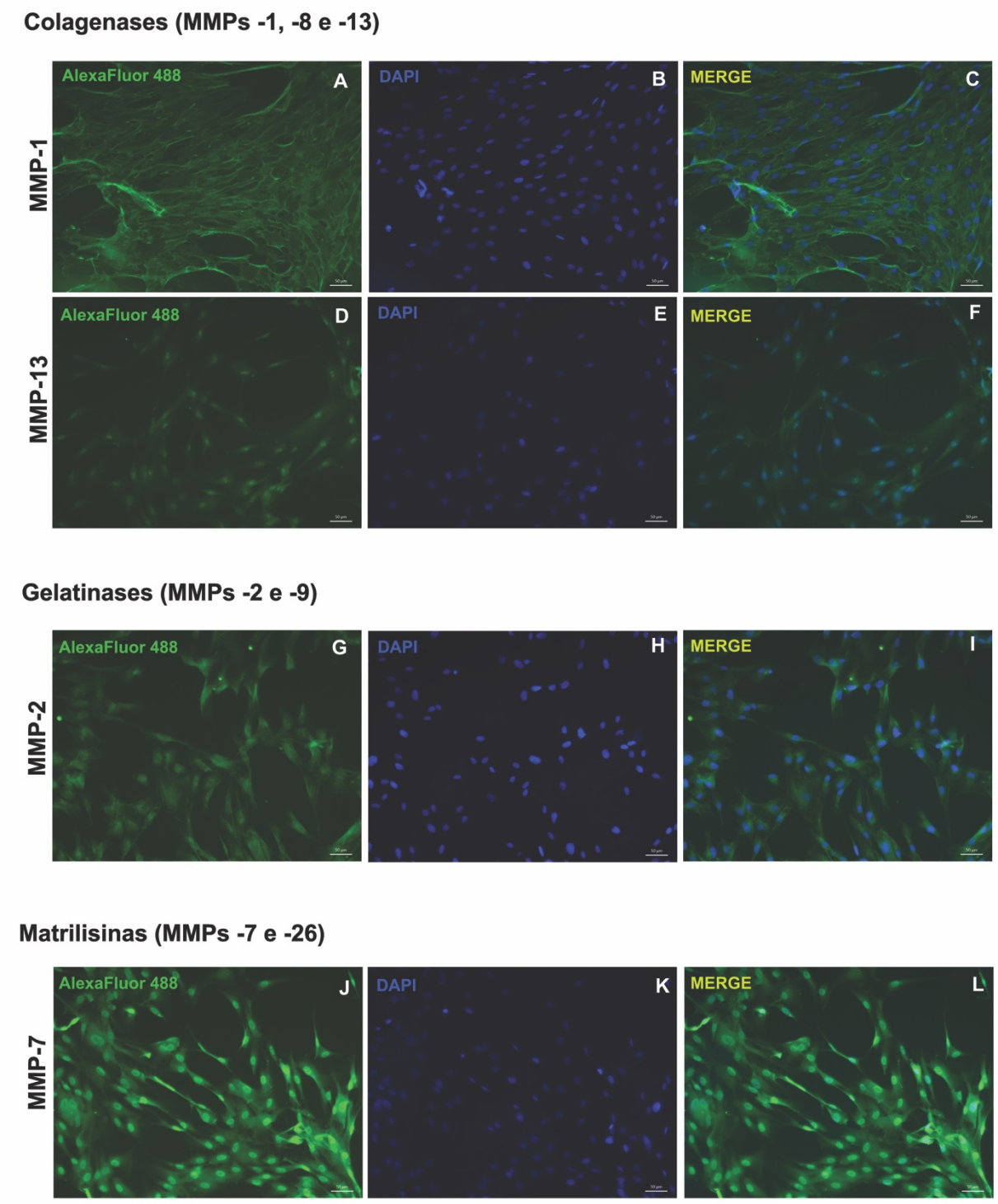


Imagem representativa da imunofluorescência das DPSCs (n=3) (A, D, G e J) células coradas pelo anticorpo primário (fluoróforo verde); (B, E, H e K) núcleos corados por DAPI (fluoróforo azul); e (C, F, I, L) sobreposição de imagens. Aumento: 200 x.

Dentre as matrilisinas (MMPs -7 e -26), a MMP-7 foi fortemente localizada dispersa no citoplasma e no perímetro perinuclear ou núcleo (Figuras 12 H-J). A MMP-26 não foi analisada.

Dentre as estromelisinas (MMPs -3, -10 e -11), a MMP-10 e a MMP-13 também foram localizadas de forma dispersa no citoplasma, porém bem fraca (Figuras 13 A-C). A MMP-3 não foi expressa pelas DPSCs e a MMP-11 não foi avaliada.

Dentre as MMPs sem grupo definido (MMPs -12, -19, -20, -23, -27 e -28), a MMP-28 foi fortemente imunolocalizada dispersa no citoplasma e no perímetro perinuclear ou núcleo (Figuras 13 D-F). As demais não foram analisadas.

Dentre as MMPs ancoradas à membrana celular via âncora GPI (MMPs -17 e -25), a MMP-25 foi imunolocalizada dispersa no citoplasma e no perímetro perinuclear ou núcleo (Figuras 13 G-I), enquanto a MMP-17 foi fracamente detectada (Figuras 13 J-L).

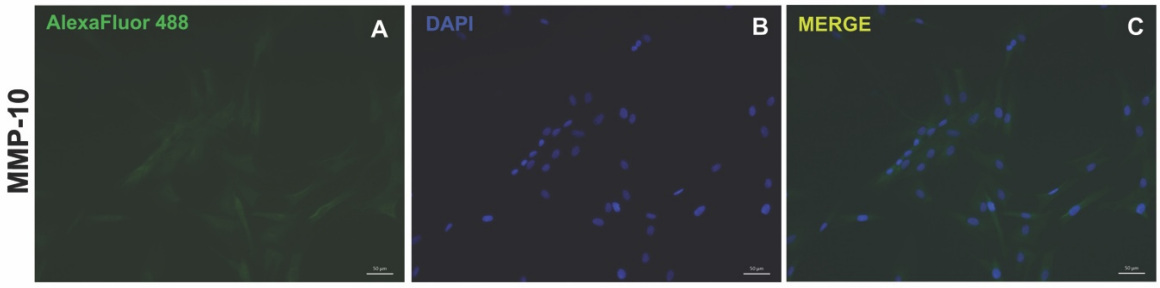
Dentre as MMPs ancoradas à membrana via domínio transmembrana (MMPs -14, -15, -16 e -24), as MMP-14, MMP-15 e MMP-16 foram imunolocalizadas na membrana celular bem como no perímetro perinuclear ou núcleo (Figuras 14 A-I), já a MMP-24 ficou restrita fracamente ao núcleo (Figuras 14 J-L).

Dentre as TIMPs, as TIMP-1 (Figuras 15 A-C) e TIMP-3 (Figuras 15 G-I) foram imunolocalizadas no citoplasma e, principalmente, no perímetro perinuclear, sendo a TIMP-1 a mais proeminente. A TIMP-2 foi imunolocalizada no citoplasma (Figuras 15 D-F). A TIMP-4 parece estar imunolocalizada na membrana celular ou perímetro pericelular, mas de forma fraca (Figuras 15 J-L). Já RECK, foi imunolocalizado de forma dispersa no citoplasma e na membrana celular (Figuras 15 M-O).

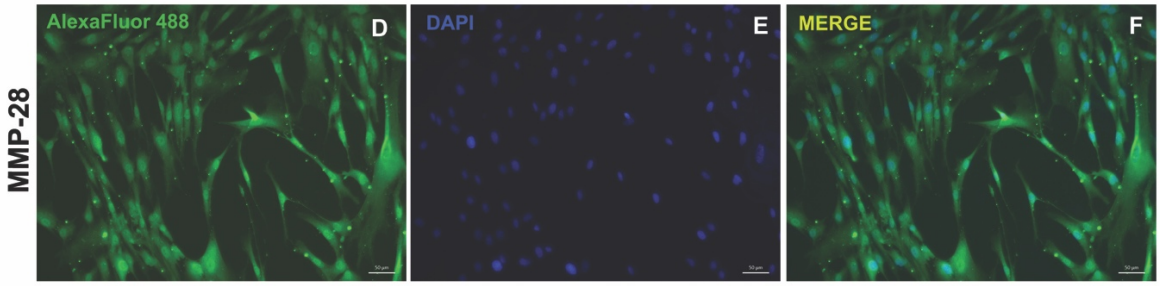
Em conjunto, houve intensa imunolocalização das MMPs -7, -14, -15, -25, -28 e TIMPs -1 e -3.

Figura 13 – Imunofluorescência das DPSCs (estromilisinas, outros e MT-MMPs)

Estromelisinas (MMPs -3, -10 e -11)



Outros (MMPs -12, -19, -20, -23, -27 e -28)



MMPs ancoradas a membrana celular via âncora GPI (MMPs -17 e -25)

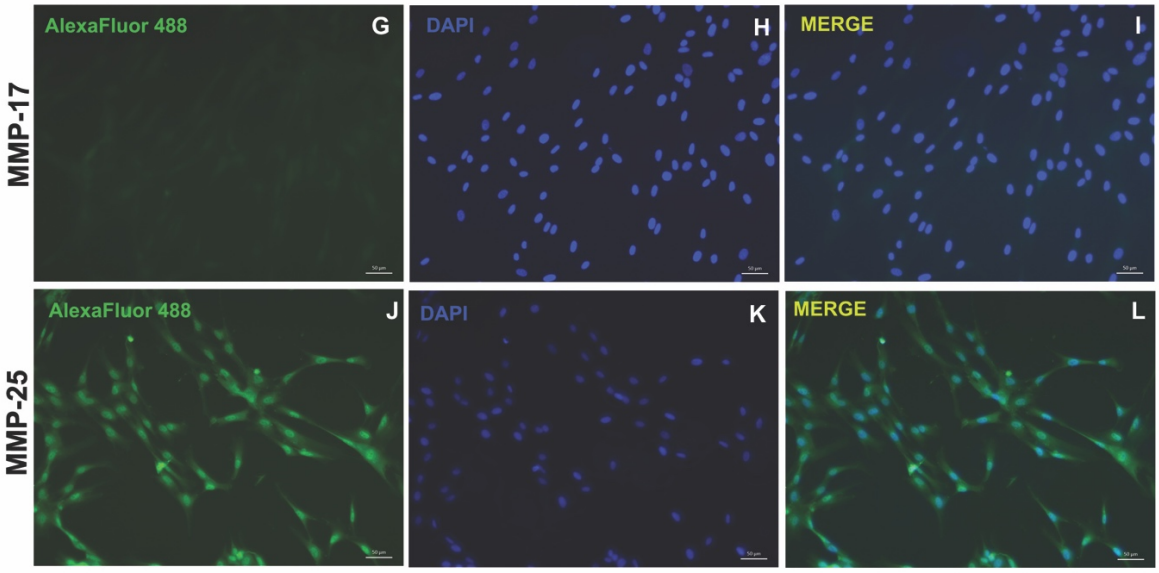


Imagem representativa da imunofluorescência das DPSCs (n=3) (A, D, G e J) células coradas pelo anticorpo primário (fluoróforo verde); (B, E, H e K) núcleos corados por DAPI (fluoróforo azul); e (C, F, I, L) sobreposição de imagens. Aumento: 200 x.

Figura 14 – Imunofluorescência das DPSCs (MT-MMPs)

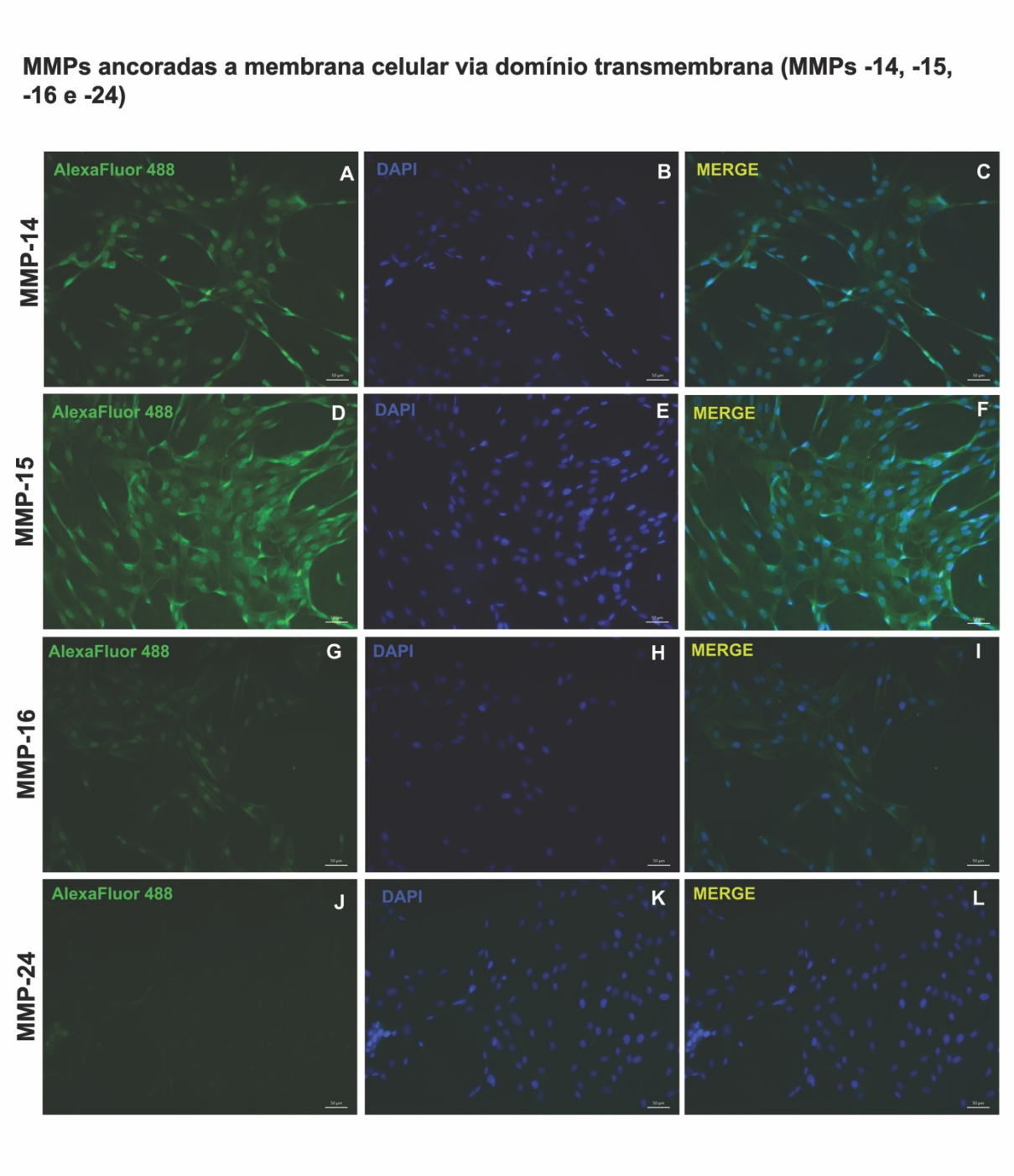


Imagem representativa da imunofluorescência das DPSCs (n=3) (A, D, G e J) células coradas pelo anticorpo primário (fluoróforo verde); (B, E, H e K) núcleos corados por DAPI (fluoróforo azul); e (C, F, I, L) sobreposição de imagens. Aumento: 200 x.

Figura 15 – Imunofluorescência das DPSCs (Inibidores das MMPs)

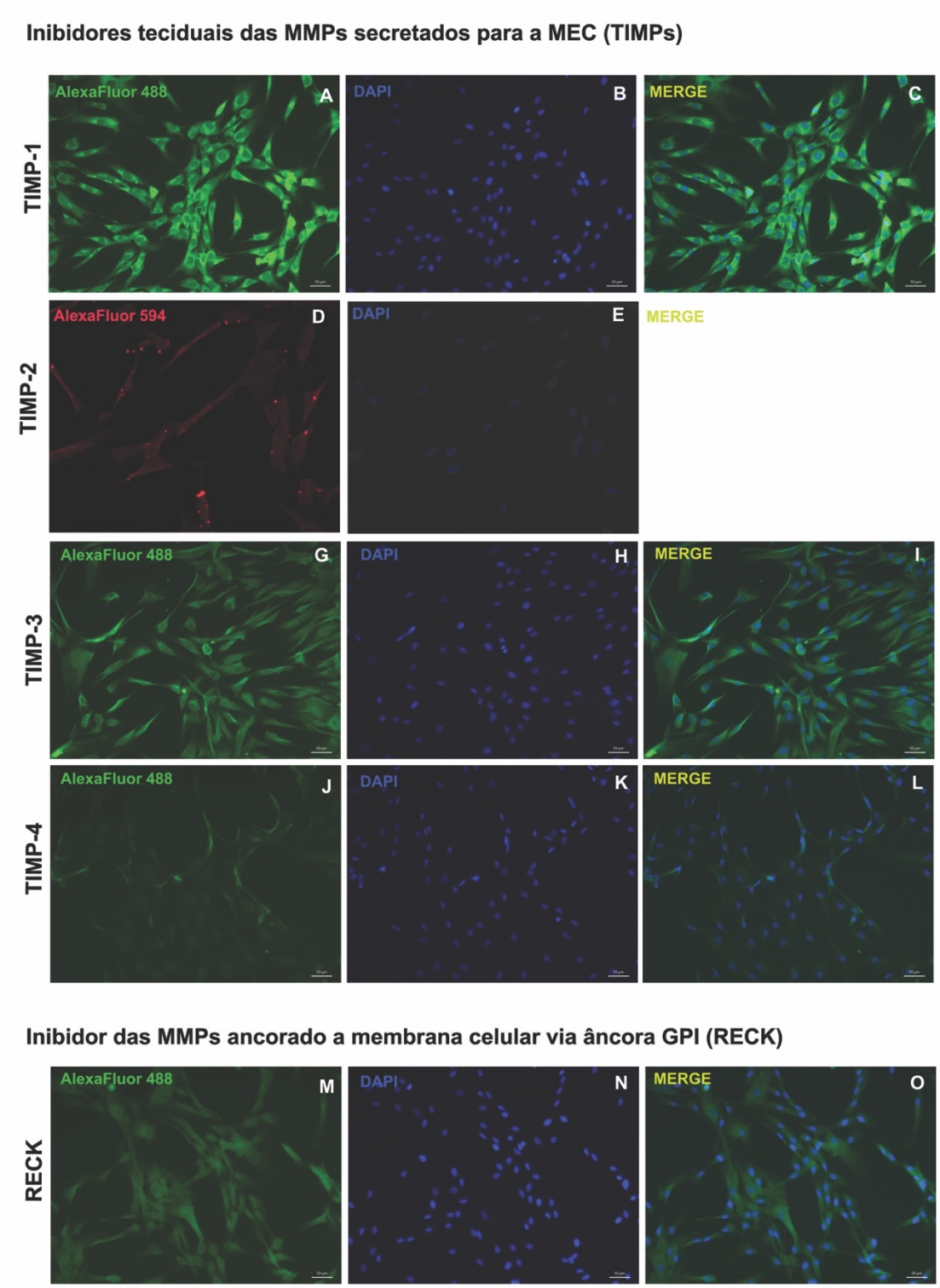


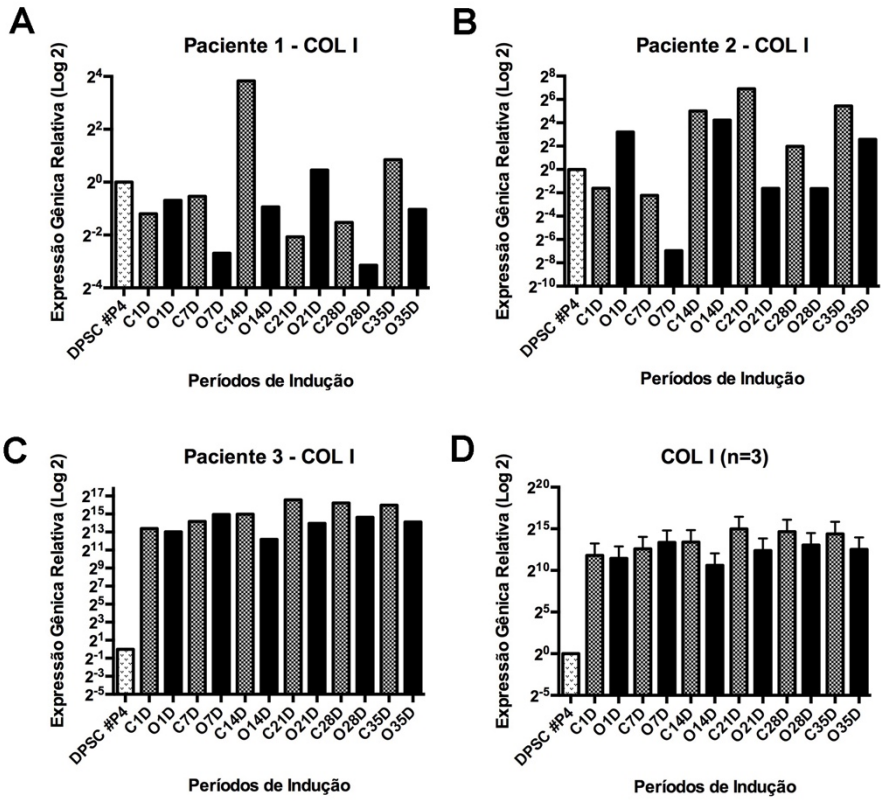
Imagem representativa da imunofluorescência das DPSCs (n=3) (A, G, J e M) células coradas pelo anticorpo primário (fluoróforo verde);(D) fluoróforo vermelho; (B, E, H, K e N) núcleos corados por DAPI (fluoróforo azul); e (C, F, I, L e O) sobreposição de imagens. Aumento: 200 x.

5.3 Avaliação da osteogênese *in vitro* a partir das DPSCs

Os experimentos para a avaliação da osteogênese *in vitro* foram realizados na #P5 para os 3 pacientes.

Os pacientes analisados apresentaram perfis de expressão gênica diferentes para o Col I, no entanto, de forma geral, foram regulados negativamente (Figuras 16A-B) ou estão com a mesma expressão em relação ao controle (Figura 16C e D).

Figura 16 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (Col I)



Análise da expressão gênica do colágeno tipo I após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias. (A) paciente 1; (B) paciente 2; (C) paciente 3 e (D) média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas; barra quadriculada cinza: DPSCs em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs em meio osteogênico.

Através da quantificação da atividade da fosfatase alcalina, foi verificado o aumento gradativo da atividade do 1° ao 14° dia e diminuição a partir do 14° dia. Sendo este um padrão esperado para este tipo de diferenciação (Figura 17).

Figura 17 – Quantificação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*

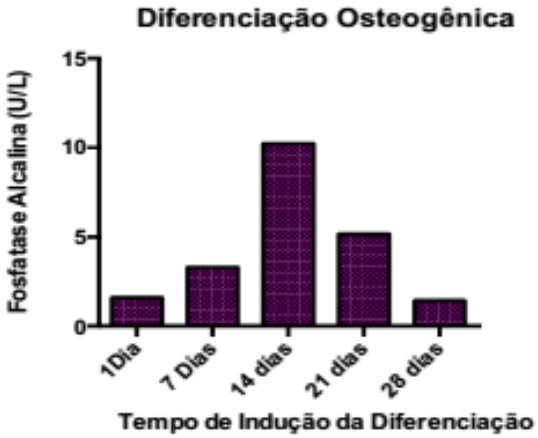
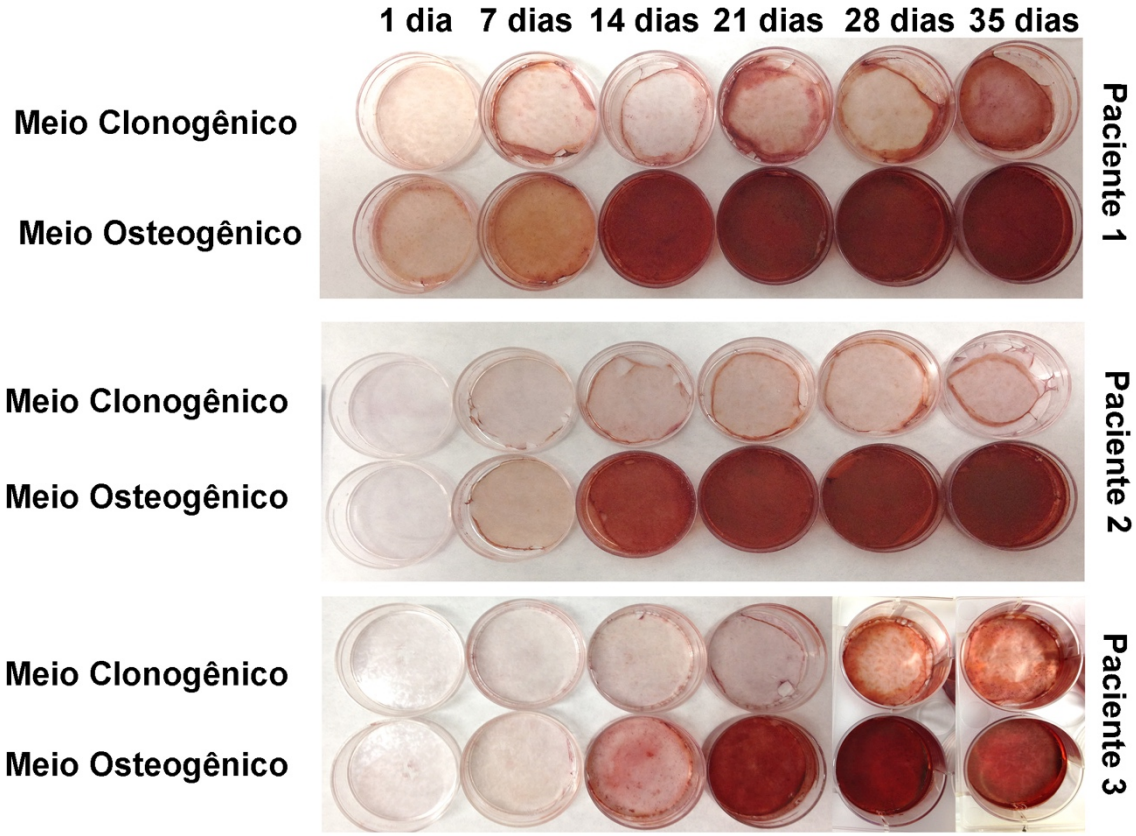


Imagem representativa da quantificação da atividade da fosfatase alcalina nas DPSCs após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* por 28 dias (n=3).

As DPSCs induzidas à diferenciação osteogênica *in vitro* formaram nódulos de mineralização corados pela Alizarina Vermelha, onde houve aumento progressivo da coloração ao longo dos períodos experimentais nas células induzidas à diferenciação osteogênica, sendo o paciente 1 a partir de 7 dias e os pacientes 2 e 3 a partir de 14 dias. Foi observado nenhuma ou pouca coloração nas células mantidas em meio clonogênico (controle) (Figuras 18 e 19).

Figura 18 – Coloração de alizarina vermelha durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (análise macroscópica)



Análise da formação de nódulos de mineralização pela coloração de alizarina vermelha após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* por 35 dias (n=3).

Figura 19 – Coloração de alizarina vermelha durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (análise microscópica)

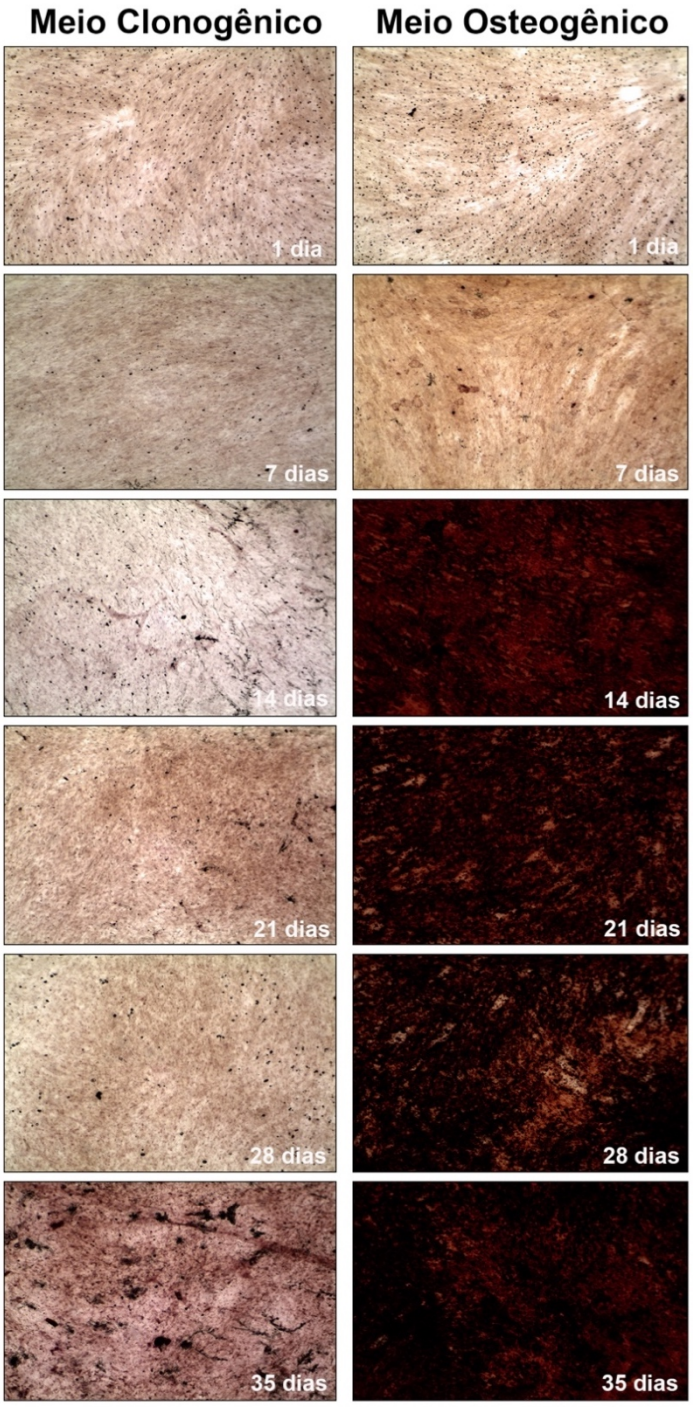


Imagem representativa da coloração dos nódulos de mineralização pela coloração de alizarina vermelha após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* por 35 dias (n=3). Aumento: 40 x.

A análise ultraestrutural das DPSCs por MET, após indução da diferenciação osteogênica por 35 dias, revelou que estas possuem mitocôndrias alongadas, proeminente retículo endoplasmático rugoso e, ainda, muitas vesículas intracelulares. Ao nível da membrana plasmática, foram observadas regiões com invaginações características de cavéolas ou bolsas clatrina-dependentes, indicando atividade secretora para a MEC ou endocitose (Figura 20A). Foram observadas fibras colágenas mineralizadas na MEC (Figura 20B). As DPSCs mantidas pelo mesmo período, só que com o meio clonogênico, também secretaram colágeno tipo I para a MEC, mas apresentaram aspecto bem diferente daquelas em diferenciação, sendo nítidas as características de célula senescente (Figura 20C) e em apoptose (Figura 20D), com a compartimentalização dos conteúdos nuclear e citoplasmático.

Figura 20 – Análise da ultraestrutura das células durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*

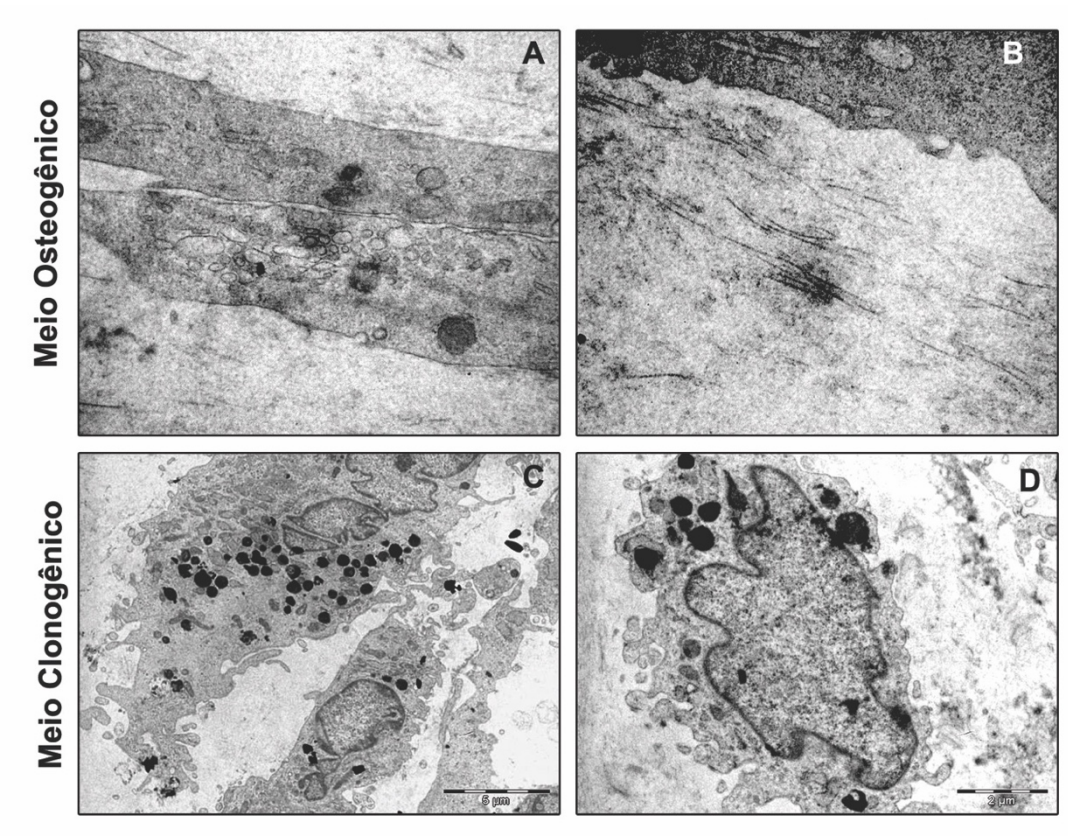


Imagem representativa da ultraestrutura das DPSCs por MET. Aumento: 10.000 x (A e C) e 20.000 x (B e D).

5.4 Avaliação da expressão gênica das MMPs e seus inibidores nas DPSCs durante a osteogênese *in vitro*

O perfil de expressão gênica da maioria das MMPs e seus inibidores, nas DPSCs isoladas, foi realizado na #P5 para os 3 pacientes.

Em determinados genes, os pacientes analisados apresentaram perfis semelhantes e, em outros, perfis distintos.

Dentre as colagenases (MMPs -1, -8 e -13), a MMP-8 não foi avaliada. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle, para o paciente 1, a MMP-1 foi regulada negativamente nas amostras induzidas à diferenciação osteogênica durante todos os períodos experimentais, exceto em 21 e 35 dias onde a expressão foi igual ao do controle (Figura 21A). Para o paciente 2, a MMP-1 foi regulada positivamente apenas em 1 e 7 dias pós-indução e, a partir deste período, regulada negativamente (Figura 21B). Para o paciente 3, foi regulada positivamente apenas em 14 dias pós-indução e regulada negativamente em todos os demais períodos (Figura 21C). Já para a MMP-13, a expressão no paciente 1 foi regulada negativamente em todas as amostras induzidas à diferenciação, exceto em 21 dias (Figura 21E). Para o paciente 2, foi regulada positivamente apenas em 1 dia pós-indução (Figura 21F). Para o paciente 3, foi regulada negativamente em todas as amostras induzidas à diferenciação (Figura 21G). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, para a MMP-1, no paciente 1, a maioria das amostras do grupo controle foram reguladas positivamente e todas do grupo osteogênico foram reladas negativamente (Figura 21A). Para o paciente 2, todas as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente, exceto controle 1 dia (Figura 21B). Para o paciente 3, as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente, exceto 1 e 7 dias do grupo osteogênico (Figura 21C). Para a MMP-13, no paciente 1, a maioria das amostras do grupo controle foram reguladas positivamente (exceto 1 e 21 dias) bem como do grupo osteogênico (exceto 1 e 7 dias) (Figura 21E). Para o paciente 2, as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente, exceto controle 1 dia e osteogênico 14 dias (Figura 21F). Para o paciente 3, as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente, exceto osteogênico 7 e 14 dias (Figura 21F). Em conjunto, o perfil de

expressão de ambas as colagenases revelou que estas são expressas nos dois grupos experimentais, no entanto, sendo mais expressa no grupo controle do que no grupo osteogênico (Figuras 21 D e H), assim, essas enzimas podem estar relacionadas tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

Dentre as gelatinases (MMPs -2 e -9), a MMP-9 não apresentou curva de *melting* e amplificação específicos e foi considerada como não amplificada, portanto, não expressa. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle no paciente 1, a MMP-2 foi regulada positivamente apenas em 35 dias pós-indução, mas apresentou expressão igual ao controle em 7, 21 e 28 dias (Figura 22A). Para o paciente 2, foi regulada positivamente de 1 a 14 dias pós-indução e, negativamente, de 21 a 35 dias (Figura 22B). No paciente 3, foi regulada negativamente em todos os períodos da indução da diferenciação osteogênica, exceto em 28 dias onde a expressão foi igual ao controle (Figura 22C). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, para o paciente 1, a maioria das amostras do grupo controle foram reguladas positivamente (exceto 1 e 35 dias) bem como as do grupo osteogênico (exceto 1 dia) (Figura 22A). Para o paciente 2, a maioria das amostras do grupo controle foram reguladas positivamente (exceto 1 e 7 dias) bem como do grupo osteogênico (exceto 7 dias) (Figura 22B). Para o paciente 3, todas as amostras de ambos os grupos foram altamente expressas (Figura 22C). Em conjunto, o perfil de expressão da MMP-2 revelou que esta é expressa nos dois grupos experimentais, no entanto, sendo um pouco mais expressa no grupo controle do que no grupo osteogênico, mas de forma muito semelhante (Figura 22 D), assim, esta enzima pode estar relacionada tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

Dentre as MMPs sem grupo definido (MMPs -12, -19, -20, -23, -27 e -28), a MMP-19 não apresentou curva de *melting* e amplificação específicos e foi considerada como não amplificada, portanto, não expressa e as MMPs -12, -20, -23 e -27 não foram avaliadas. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle para a MMP-28, verificamos um perfil distinto para o paciente 1 e bem semelhante dos pacientes 2 e 3 semelhantes nos 3 pacientes analisados. Para o

paciente 2, houve regulação positiva em 1, 7, 14 e 28 dias pós-indução, regulação negativa apenas em 21 dias e expressão igual ao controle em 35 dias (Figura 22F). No paciente 3, houve regulação positiva em 1, 7, 14 e 35 dias pós-indução, regulação negativa em 21 dias e expressão igual ao controle em 28 dias (Figura 22G). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, no paciente 1, praticamente, todas as amostras foram reguladas negativamente (Figura 22E), enquanto nos pacientes 2 e 3, todas as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente (Figuras 22 F-G). Em conjunto, o perfil de expressão da MMP-28 revelou que esta é expressa nos dois grupos experimentais, no entanto, sendo mais expressa no grupo osteogênico do que no grupo controle (Figura 22 H), assim, esta enzima pode estar relacionada tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

Dentre as estromelisinas (MMPs -3, -10 e -11), a MMP-11 não foi avaliada. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle para a MMP-3, o paciente 1, foi regulado negativamente, exceto em 35 dias (Figura 23A) e um perfil semelhante foi visto para o paciente 2, exceto em 14 dias pós-indução (Figura 23B). Já no paciente 3, houve regulação positiva de 14 a 35 dias pós-indução (Figura 23C). Analisando a relação amostras grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, no paciente 1, apenas as amostras controle 28 dias e osteogênico 28 dias foram reguladas positivamente (Figura 23A), para o paciente 2, todas as amostras foram reguladas positivamente, exceto 35 dias (Figura 23B) e para o paciente 3, apenas as amostras de 14 a 35 dias pós-indução foram reguladas positivamente (Figura 23C). Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle para a MMP-10, houve um perfil semelhante em todos os 3 pacientes, sendo que todas as amostras foram reguladas negativamente para os pacientes 1 (Figura 23E) e 3 (Figura 23G), com exceção do osteogênico 1 dia para o paciente 2 (Figura 23F). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, no paciente 1 apenas as amostras do grupo controle foram reguladas positivamente (Figura 23E) e para os pacientes 2 e 3 todas as amostras foram reguladas positivamente (exceto controle 1 dia para o paciente 2) (Figuras 23 F-G). Em conjunto, o perfil de expressão de

ambas as estromelisinas revelou que essas são expressas nos dois grupos experimentais, no entanto, sendo mais expressa no grupo controle que no grupo osteogênico (Figuras 23 D e H), assim, estas enzimas podem estar relacionadas tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

As matrilisinas (MMPs -7 e -26) não foram avaliadas.

Dentre as MMPs ancoradas à membrana via domínio transmembrana (MMPs -14, -15, -16 e -24), a MMP-24 não foi avaliada. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle para a MMP-14, no paciente 1, houve regulação positiva em 7, 14, 21 e 35 dias pós-indução e, negativa, apenas em 28 dias (Figura 24A). No paciente 2, a MMP-14 foi regulada positivamente em 1 a 14 dias pós-indução e, negativamente, de 21 a 35 dias (Figura 24B). Já no paciente 3, houve regulação positiva em todos os períodos, exceto em 1 dia pós-indução (Figura 24C). Para a MMP-15, tanto o paciente 1 quanto o 3, apresentaram regulação positiva de 7 a 35 dias pós indução (Figuras 24 E e G), enquanto o paciente 2 apresentou regulação positiva de 1 a 14 dias e, negativa, de 21 a 35 dias (Figura 24F). Para a MMP-16, houve uma expressão bastante distinta entre os 3 pacientes analisados, oscilando ora maior expressão no grupo controle ora maior no grupo osteogênico (Figuras 24I-K). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, a MMP-14, no paciente 1, foi regulada positivamente no grupo osteogênico de 14 a 35 dias e, no grupo controle, em 14 e 28 dias (Figura 24A). Já os pacientes 2 e 3, tiveram regulação positiva da expressão em todos os períodos experimentais e em ambos os grupos, exceto a amostra controle 7 dias no paciente 2 (Figuras 24B-C). Para a MMP-15, houve regulação positiva das amostras do grupo osteogênico de 7 a 35 dias e, do grupo controle, apenas em 28 dias (Figura 24E). Já nos pacientes 2 e 3, todas as amostras de ambos os grupos foram reguladas positivamente (Figuras 24F-G). Em conjunto, o perfil de expressão das MT-MMPs ancoradas via domínio transmembrana revelou que essas são expressas nos dois grupos experimentais, no entanto, sendo mais expressa no grupo osteogênico que no grupo controle (Figuras 24 D, H e L), assim, estas enzimas podem estar relacionadas tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

Dentre as MMPs ancoradas à membrana celular via âncora GPI (MMPs -17 e -25), a MMP-25 não apresentou curva de *melting* e amplificação específicos e foi considerada como não amplificada, portanto, não expressa. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle para a MMP-17, no paciente 1, foi regulada positivamente em 7, 14, 21 e 35 dias pós-indução (Figura 25A). Para o paciente 2, foi regulada positivamente de 1 a 7 dias pós-indução, com expressão igual ao controle em 14 dias e regulação negativa de 21 a 35 dias (Figura 25B). No paciente 3, houve regulação positiva de 7 a 35 dias pós-indução (Figura 25C). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, a MMP-17 foi regulada positivamente em ambos os grupos experimentais nos 3 pacientes avaliados, exceto a amostra controle 14 dias no paciente 1 e osteogênico 1 dia no paciente 3 (Figuras 25A-C). Em conjunto, o perfil de expressão da MMP-17 revelou que essa é expressa no grupo osteogênico de 1 a 7 dias e mais expressa no grupo controle de 21 a 35 dias (Figura 25D), assim, esta enzima pode estar relacionada tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica em estágios iniciais.

Já para o inibidor das MMPs ancorado à membrana celular via âncora GPI (RECK), o perfil de expressão nos 3 pacientes avaliados foi bastante discrepante. Analisando a relação indução da diferenciação vs. controle, no paciente 2, somente houve regulação positiva em 1 dia pós-indução (Figura 25F) e, no paciente 3, apenas regulação positiva em 14 dias (Figura 25G). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, RECK, no paciente 1, foi regulado negativamente em todos os períodos experimentais para ambos os grupos (Figura 25E), enquanto no paciente 3, foi regulado positivamente em todos os períodos experimentais para ambos os grupos (Figura 25G). No paciente 2, houve regulação positiva apenas para as amostras 1 e 14 dias no grupo osteogênico e 14, 21 e 35 dias no grupo controle (Figura 25G). Em conjunto, o perfil de expressão de RECK revelou que este é expresso em ambos os grupos experimentais (Figura 25H), assim, esta proteína pode estar relacionada tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

Dentre os inibidores teciduais das MMPs secretados para a MEC (TIMPs), analisando a relação indução da diferenciação vs. controle, a TIMP-1, no paciente 1, foi regulada positivamente em todos os períodos experimentais, exceto 28 dias (Figura 26A). No paciente 2, regulação positiva apenas em 1 e 14 dias pós-indução (Figura 26B). O paciente 3 apresentou um perfil bastante semelhante ao paciente 1, diferindo por ser regulado negativamente em 1 dia pós-indução e com expressão semelhante ao controle ou ligeiramente maior nos demais períodos experimentais (Figura 26C). Para a TIMP-2, no paciente 1, houve regulação positiva em 1, 7, 21 e 35 dias pós-indução (Figura 26E). No paciente 2, houve regulação positiva somente em 1 e 14 dias pós-indução (Figura 26F). No paciente 3, houve regulação positiva de 1 a 14 dias e em 35 dias e expressão igual ao do controle em 21 e 28 dias (Figura 26G). Para a TIMP-3, apenas o paciente 3 apresentou expressão superior à da DPSC (Figuras 27A-B), havendo regulação positiva de 14 a 35 dias pós-indução (Figura 27C). Para a TIMP-4, o paciente 1 não apresentou expressão superior à da DPSC (Figuras 27E). No paciente 2, houve regulação positiva de 1 a 14 dias pós-indução e, negativa, de 21 a 35 dias (Figura 27F). No paciente 3, houve regulação positiva em 7, 14, 28 e 35 dias pós-indução, regulação negativa em 1 dia e expressão igual ao controle em 21 dias (Figura 27G). Analisando a relação das amostras do grupo controle e osteogênico vs. DPSCs, a TIMP-1 foi regulada positivamente em todos os períodos experimentais e em ambos os grupos nos pacientes 1 e 3, com exceção da amostra osteogênico 1 dia no paciente 3 (Figuras 26A e C). Já para o paciente 2, houve regulação positiva apenas para as amostras controle 14, 21 e 28 dias e osteogênico 14 dias (Figura 26B). De forma semelhante, a TIMP-2 foi regulada positivamente em todos os períodos experimentais e em ambos os grupos nos pacientes 1 e 3 (Figuras 26E e G). Ainda de forma semelhante para o paciente 2, houve regulação positiva apenas para as amostras controle 14, 21 e 28 dias e osteogênico 14 dias (Figura 26F). Para a TIMP-3, os pacientes 1 e 2 apresentaram perfil semelhante, onde todas as amostras de ambos os grupos experimentais foram reguladas negativamente (Figuras 27A-B). Para o paciente 3, todas as amostras de ambos os grupos experimentais foram reguladas positivamente, exceto a amostra osteogênico 1 dia (Figuras 27C). Para a TIMP-4, no

paciente 1 todas as amostras de ambos os grupos experimentais foram reguladas negativamente (Figura 27A), enquanto nos pacientes 2 e 3, todas as amostras de ambos os grupos experimentais foram reguladas positivamente, exceto a amostra controle 1 dia (Figuras 27A-B). Em conjunto, o perfil de expressão das TIMPs revelou que estas são expressas em ambos os grupos experimentais, assim, estas proteínas podem estar relacionadas tanto à manutenção do estado indiferenciado das DPSCs quanto à diferenciação osteoblástica.

5.5 Avaliação da expressão protéica após a indução da osteogênese *in vitro*

O perfil de expressão protéica, nas DPSCs isoladas, foi realizado na #P5.

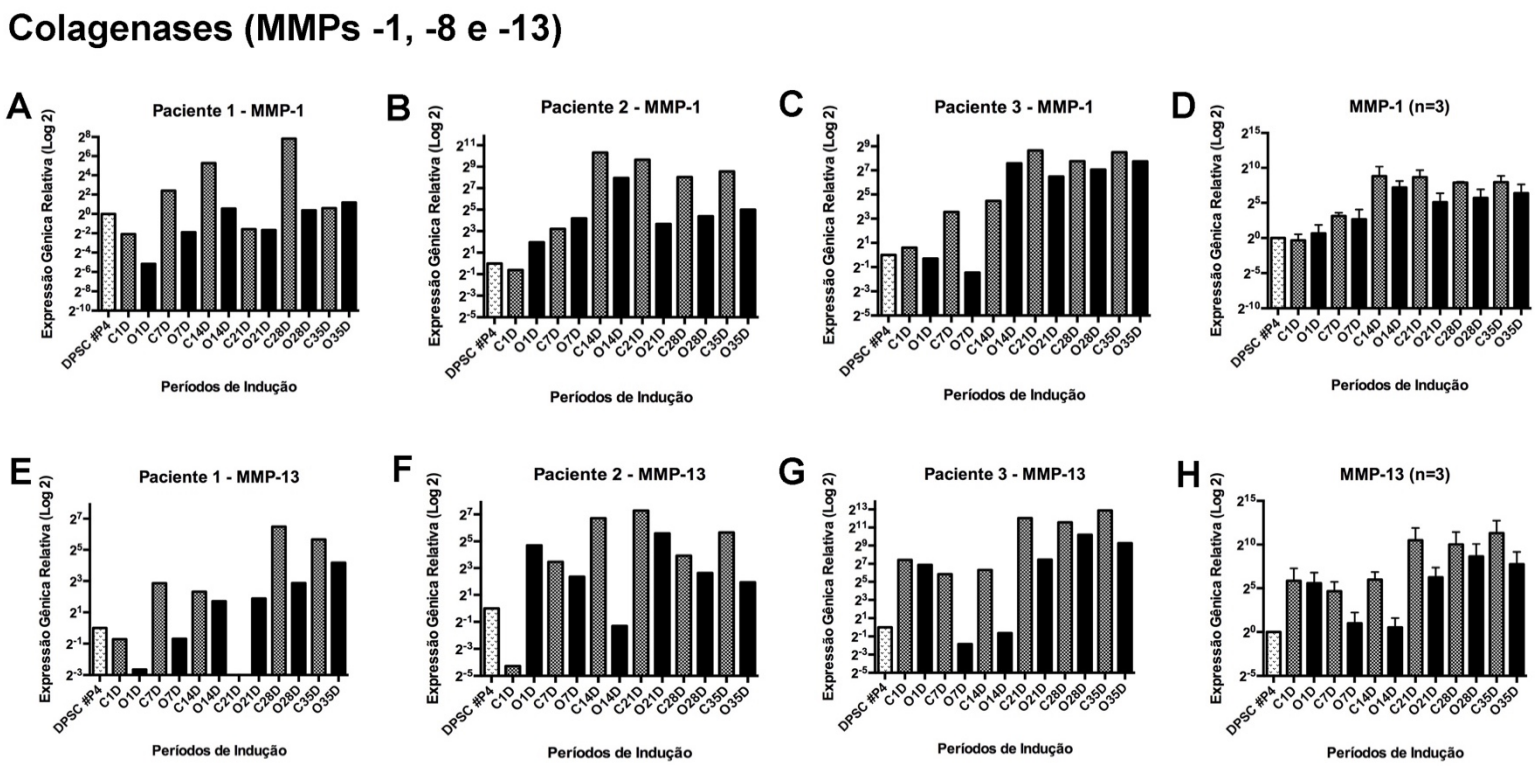
A análise da expressão protéica e os dados apresentados são referentes às amostras de proteínas do paciente 2 (controle e diferenciação osteogênica).

Para a MMP-2, foram detectadas 3 bandas específicas relacionadas às formas inativa (pró-enzima), intermediária e ativa. A pró-enzima foi detectada em todas as amostras do controle e com forte diminuição em 35 dias. Em relação às amostras da indução da diferenciação osteogênica, todas apresentaram esta forma e de forma aumentada ao longo dos períodos experimentais. A forma intermediária foi detectada em todas as amostras. A forma ativa começou a ser detectada a partir de 14 dias tanto no controle quanto na diferenciação osteogênica, sendo visivelmente aumentada de 28 a 35 dias durante a diferenciação osteogênica em relação ao controle e em relação as formas intermediária e pró-enzima (Figura 28A e B).

Para a MMP-14, foram detectadas 2 bandas específicas relacionadas as formas inativa e ativa. De forma geral, a forma ativa foi detectada em todas as amostras, mas havendo notável aumento durante a diferenciação osteogênica de 28 a 35 dias em relação ao controle e em relação a forma inativa (Figura 28A e C).

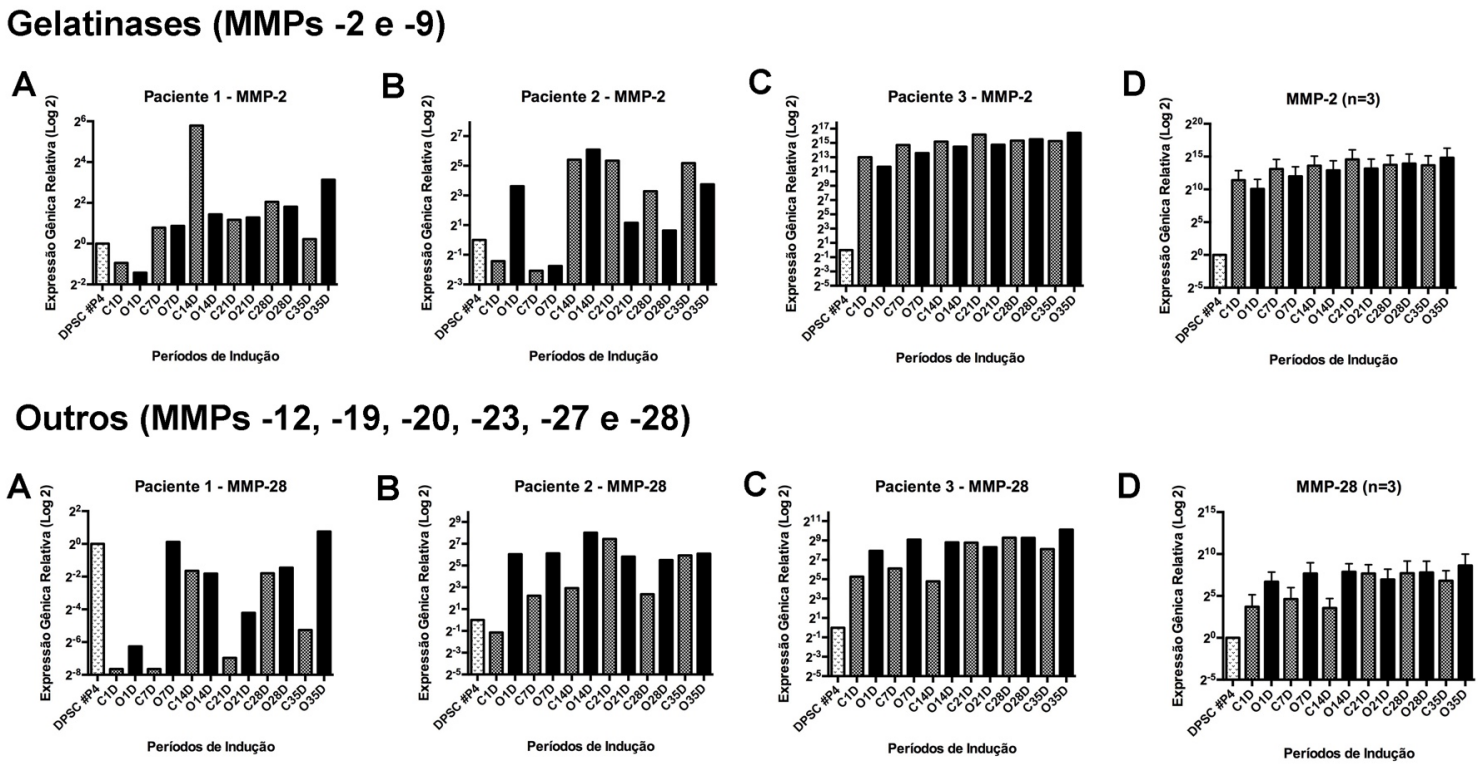
Em conjunto, o aumento da forma ativa da MMP-14 está relacionado à ativação da pró-MMP-2 de 28 a 35 dias pós-indução, sugerindo atividade colagenolítica e gelatinolítica, respectivamente, sendo estes períodos relacionados à fase final da diferenciação osteoblástica e mineralização.

Figura 21 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (colagenases)



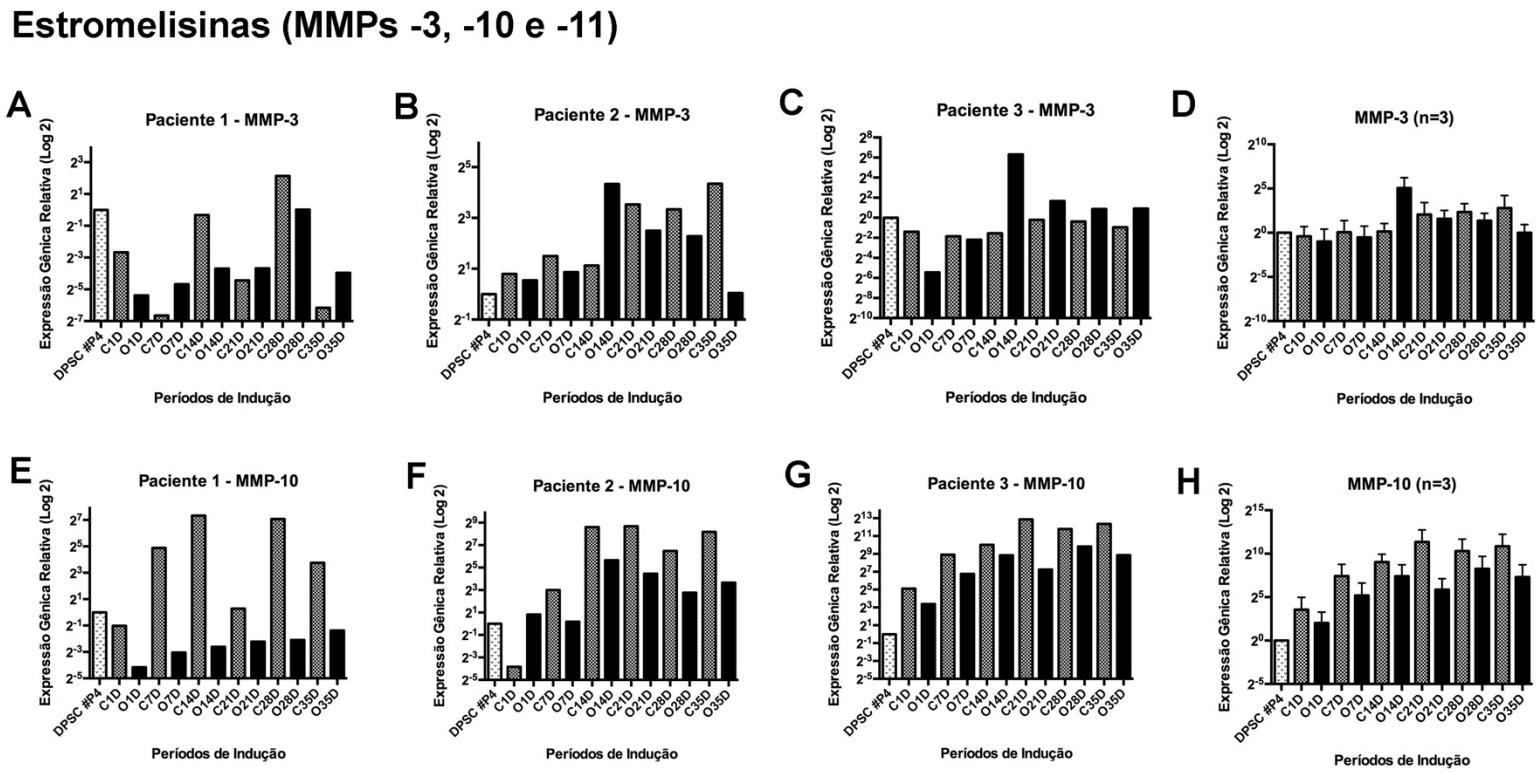
Análise da expressão gênica da MMP-1 e MMP-13 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

Figura 22 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (gelatinases e outros)



Análise da expressão gênica da MMP-2 e MMP-28 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

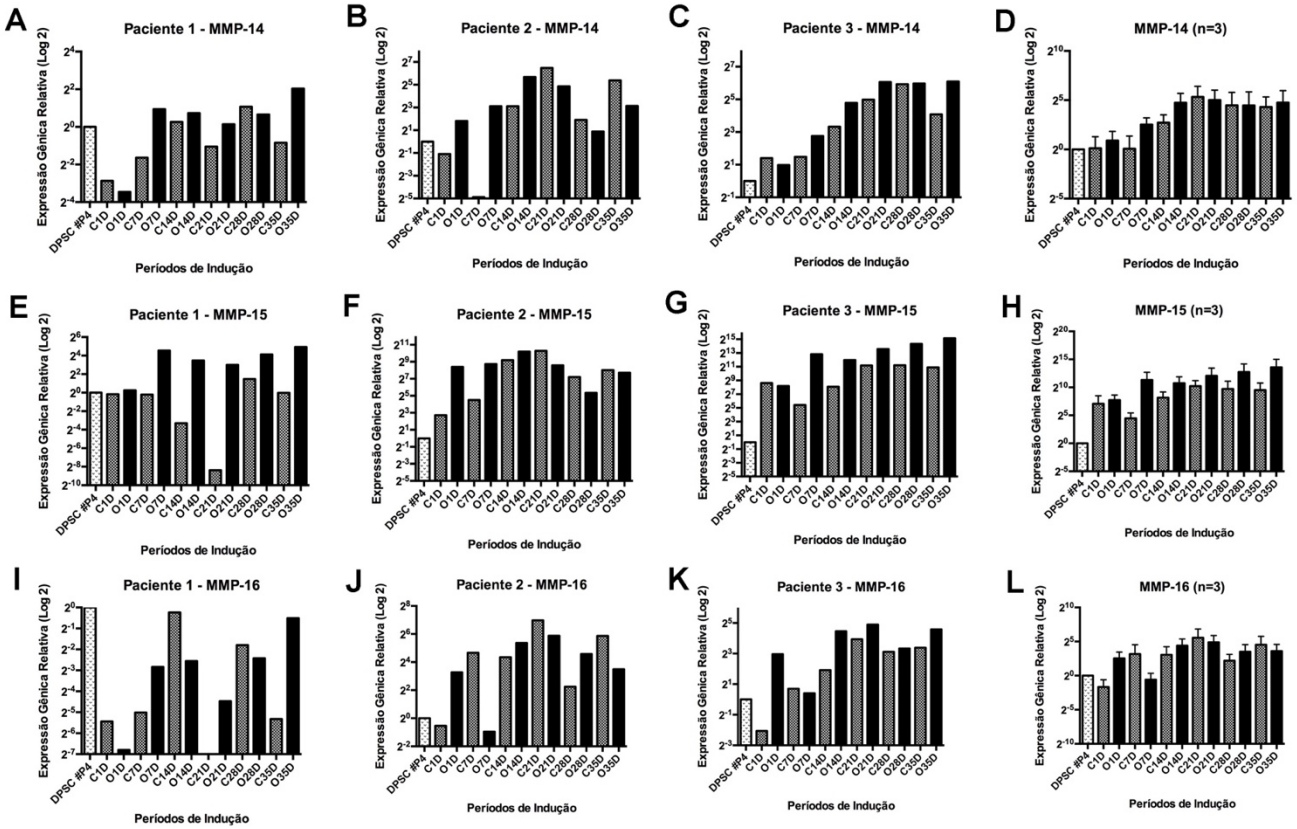
Figura 23 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (estromelisinas)



Análise da expressão gênica da MMP-3 e MMP-10 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

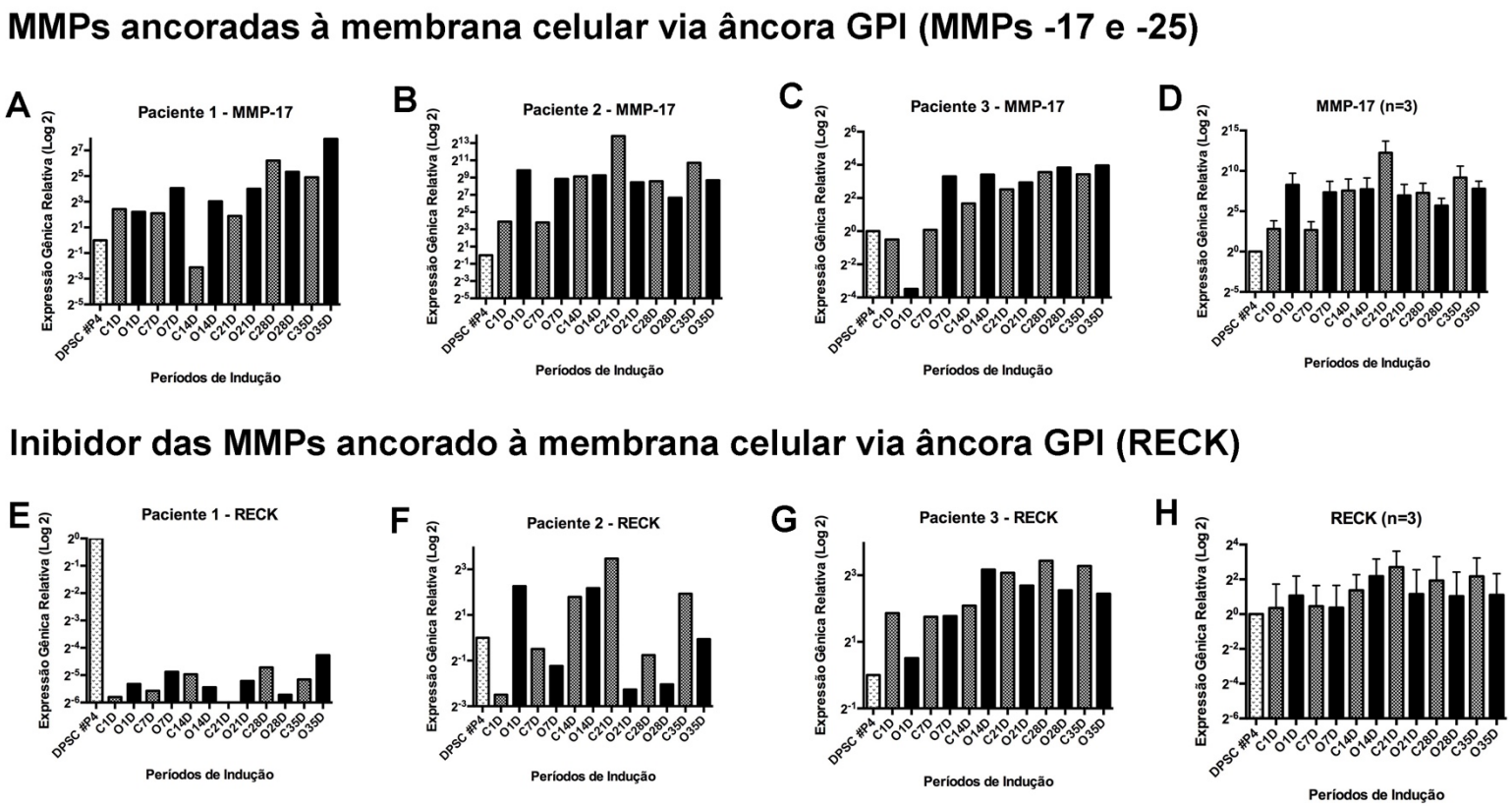
Figura 24 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (MT-MMPs)

MMPs ancoradas à membrana via domínio transmembrana (MMPs -14, -15, -16 e -24)



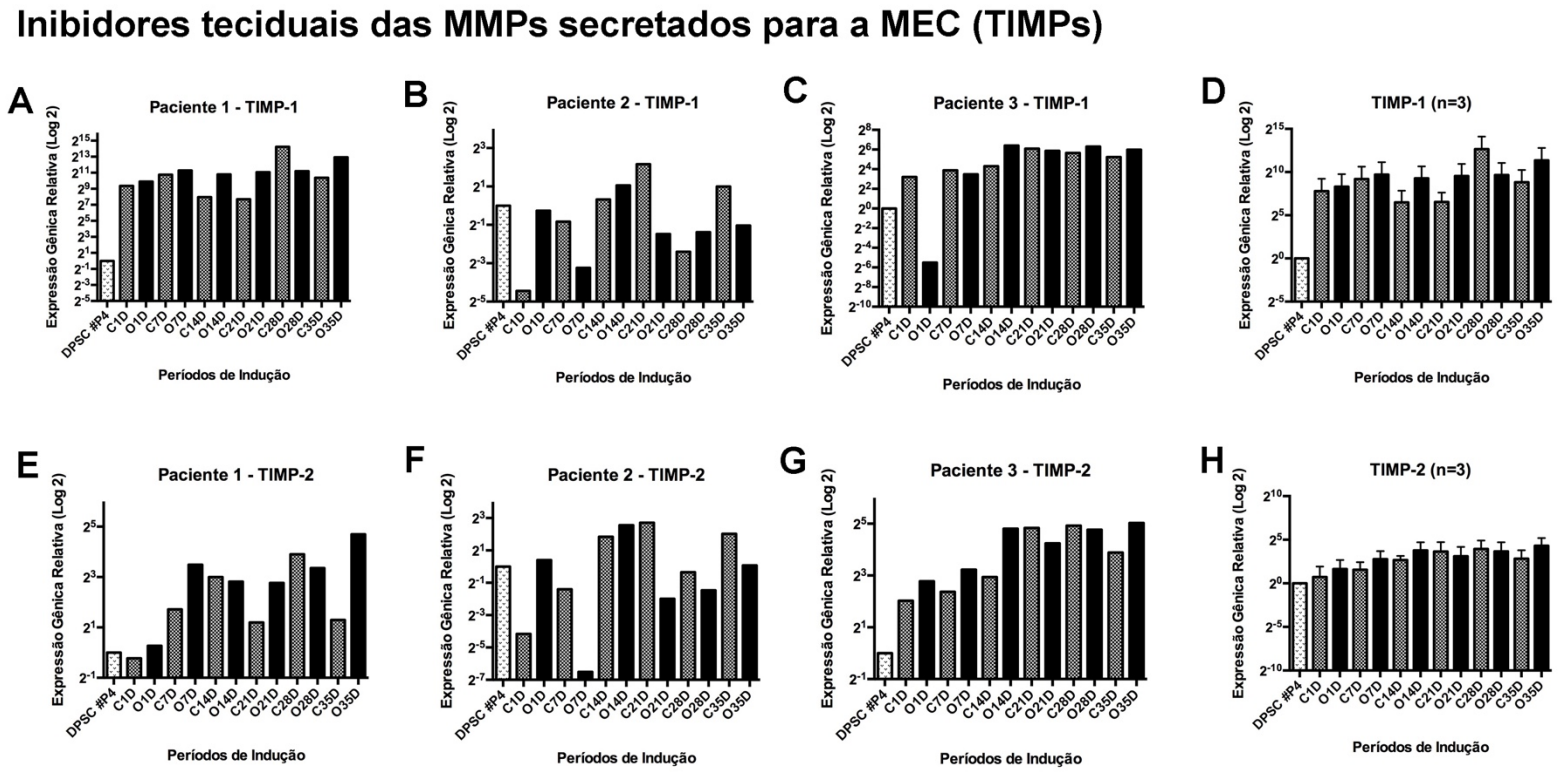
Análise da expressão gênica da MMP-14, MMP-15 e MMP-16 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

Figura 25 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (MT-MMP e inibidor de MMP)



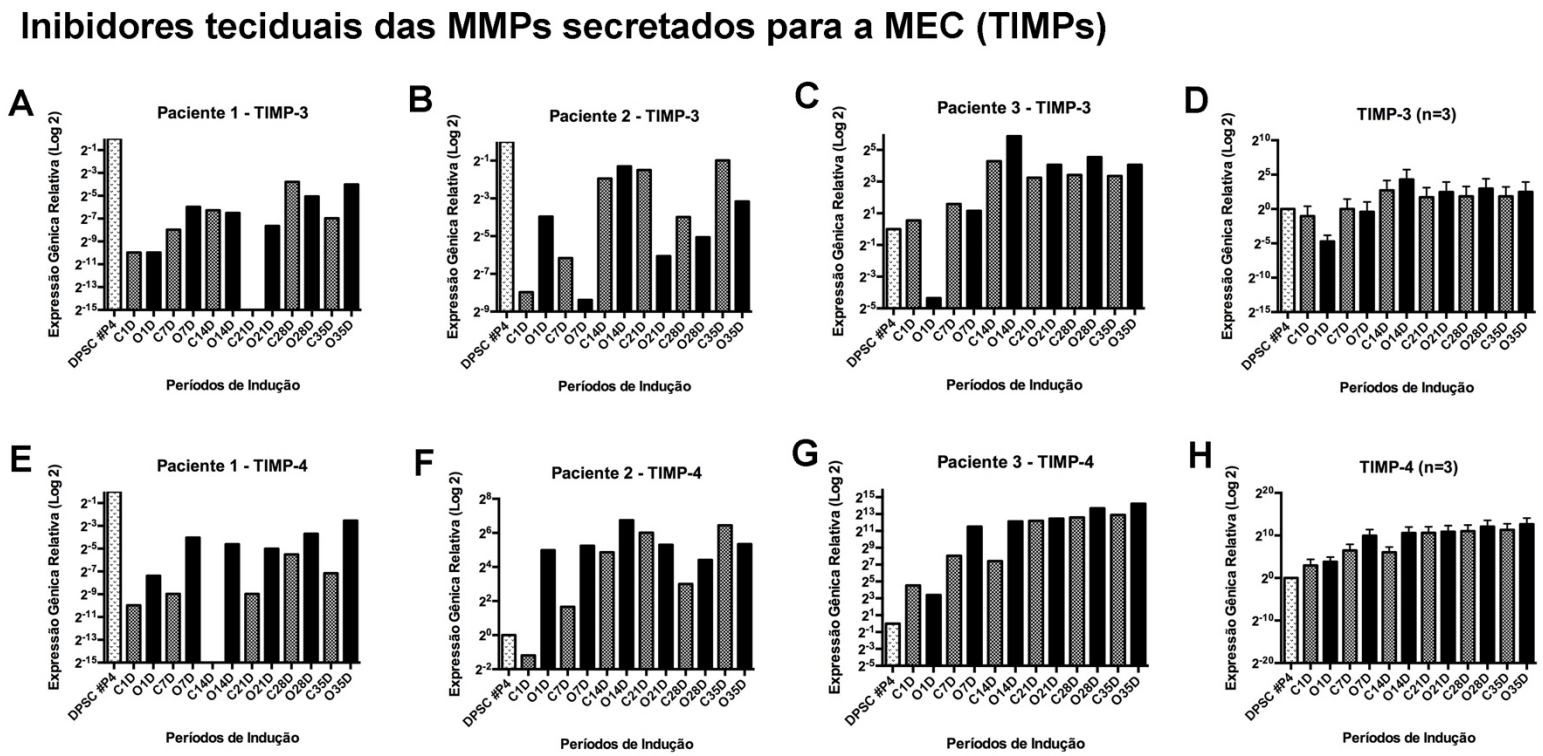
Análise da expressão gênica da MMP-17 e RECK após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

Figura 26 – Expressão gênica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* (inibidores de MMPs)



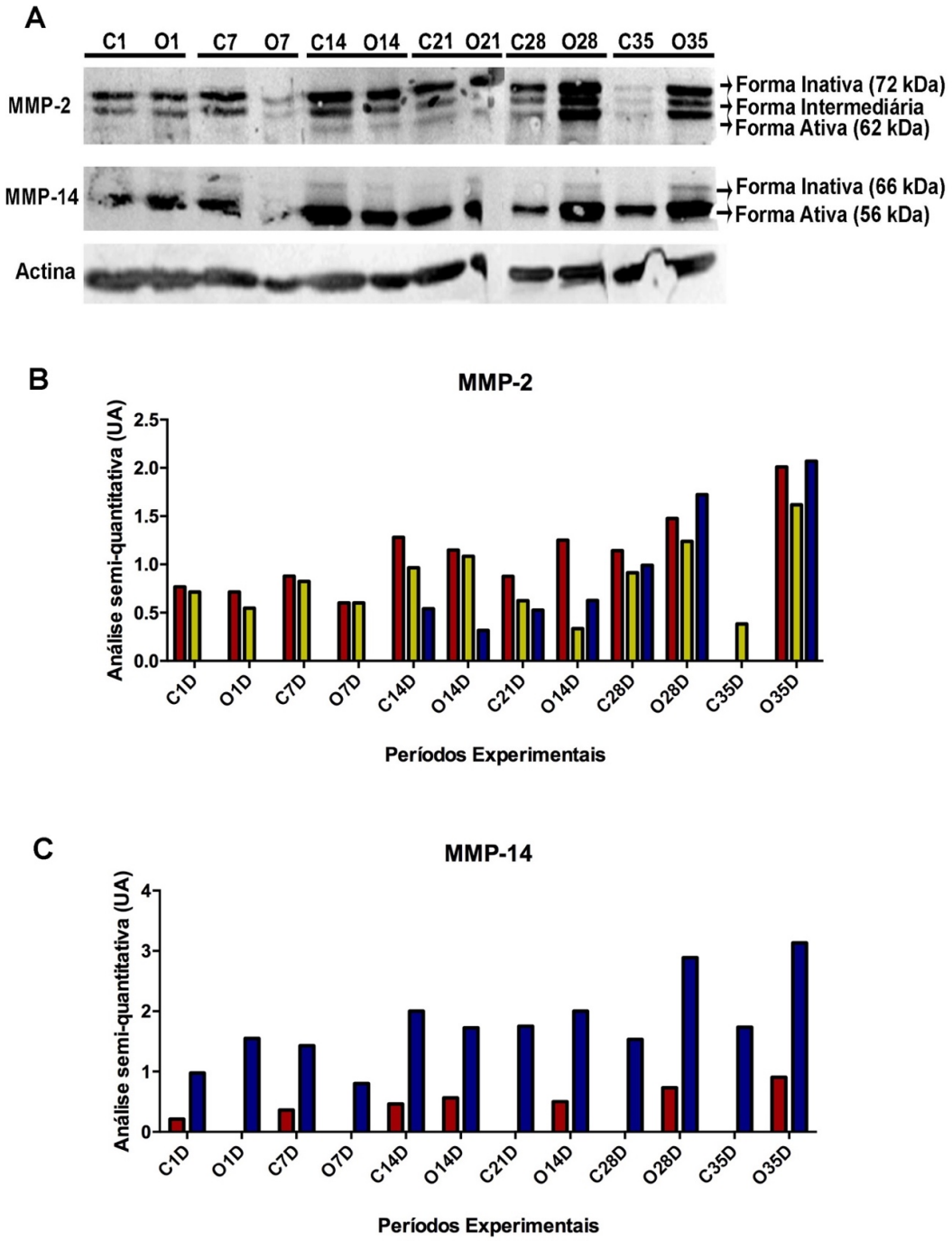
Análise da expressão gênica da TIMP-1 e TIMP-2 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

Figura 27 – Expressão gênica das DPSCs (inibidores de MMPs)



Análise da expressão gênica da TIMP-3 e TIMP-4 após a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias para os pacientes 1, 2, 3 e média (n=3). Amostra calibradora: DPSCs indiferenciadas (#P4). Gene endógeno: B-actina. Barra branca: DPSCs indiferenciadas (#P4); barra quadriculada cinza: DPSCs cultivadas em meio clonogênico (controle) e barra preta: DPSCs cultivadas em meio osteogênico.

Figura 28 – Expressão protéica durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro*



Análise da expressão protéica após indução da diferenciação osteogênica *in vitro* das DPSCs por 35 dias (n=1). (A) Bandas obtidas por western blotting e (B e C) análise semi-quantitativa (unidade arbitrária). Proteína endógena: actina. Barra vermelha: forma inativa (pró-enzima); barra amarela: forma intermediária; barra azul: forma ativa.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho traz o primeiro relato sobre a expressão das MMPs e seus inibidores nas células-tronco da polpa dentária humana bem como a modulação da expressão gênica durante a indução da diferenciação óssea *in vitro*.

6.1 Identificação das MMPs/TIMPs/RECK nas DPSCs

É bastante conhecido que as MMPs e TIMPs são expressas por células do complexo dentina-polpa dentária humana sadia: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Palosaari et al., 2000, 2002, 2003; Sulkala et al., 2002, 2004) e a modulação da expressão está relacionada à eventos de progressão da cárie na dentina (Chaussain et al., 2013; Tjaderhane et al., 2015) e progressão de lesões periapicais (D'addazio et al., 2014). No entanto, a expressão das MMPs/TIMPs nunca foi associada às DPSCs não somente no complexo dentina-polpa dentária, como também em outras regiões mais centrais da polpa dentária. Nosso grupo tem estudado a localização das MMPs/TIMPs associadas aos marcadores de superfície celular de MSCs em diversos nichos da polpa dentária, inclusive, a primeira descrição de RECK neste tecido (Rolim – dados não publicados). Assim, essa expressão em uma população heterogênea de DPSCs pode ser importante para a manutenção do estado indiferenciado destas células nesses nichos teciduais específicos e, ainda, as DPSCs isoladas podem continuar a expressá-las *in vitro*. A grande maioria das MMPs foram diferencialmente localizadas em diversas regiões celulares das DPSCs, sendo que a expressão mais proeminente foi das MMPs -7, -14, -15, -25, -28 e TIMPs -1 e -3 e, ainda, detectamos as formas inativa e ativa das MMP-2 e MMP-14, reforçando essa nossa teoria.

Recentes trabalhos têm mostrado a expressão de MMPs/TIMPs em MSCs derivadas da medula óssea (Lozito et al., 2011), tecido muscular e adiposo (Lozito et al., 2011, 2014) e que elas estão bastante relacionadas à uma atividade enzimática bem restrita ao perímetro pericelular e à inibição desta atividade pelas TIMPs.

Nossos resultados também mostraram que a maioria das MT-MMPs foram imunolocalizadas nas DPSCs bem como todas as TIMPs.

6.2 Modulação da expressão gênica das MMPs/TIMPs/RECK durante a indução da diferenciação osteogênica *in vitro* a partir das DPSCs

Um obstáculo prático na aplicação das MSCs é sua tendência de diferenciação espontânea decorrente do extenso cultivo *in vitro*. Especificamente, a osteogênese parece ser uma via de diferenciação padrão para culturas de longo prazo, levando-as à senescência e a perderem o seu potencial terapêutico. No entanto, *in vivo*, estes processos nas MSCs residentes são prevenidos devido aos nichos teciduais especializados (Sethe et al., 2006). A recapitulação destes nichos pode permitir extensa expansão das MSCs sem a perda de seu potencial de multi-diferenciação *in vitro*. Para que isto se torne viável é necessário a compreensão da natureza do nicho das MSC.

Neste sentido, a caracterização realizada em baixa passagem (#P4) nos 3 pacientes utilizados neste trabalho revelou que todos apresentaram positividade para os marcadores de superfície celular característicos de MSCs, alta taxa proliferativa, metabolismo celular adequado ao seu status celular por não estarem em senescência e com viabilidade celular, pela análise da atividade mitocondrial, potencial clonogênico em baixa densidade e capacidade de diferenciação adipogênica. Isso suporta que a diferenciação osteogênica, constatada pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização verificados nestas células, é resultado da indução com o meio osteogênico padrão: 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) (Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999). No entanto, mantivemos as DPSCs em meio clonogênico também por 35 dias e, em muitos casos, a expressão gênica das MMPs/TIMPs/RECK foi inferior ou igual ao controle, podendo ter havido a diferenciação espontânea de uma fração destas células e, como observado pela análise ultraestrutural, estas células estão senescentes e apoptóticas. Outra observação é que não houve diferença nos níveis

de expressão gênica do colágeno tipo I entre os grupos controle e osteogênico, provavelmente, devido a presença do ácido ascórbico na mesma concentração em ambos os meios de cultura.

Alguns trabalhos mostraram que o ácido ascórbico em baixas concentrações estimulam as MMPs e, em altas concentrações, as inibem (Philips et al., 2007). O ácido ascórbico aumenta a expressão de RECK e TIMP-2 durante a indução da diferenciação osteoblástica da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3 (Zambuzzi et al., 2009). De forma contrária, a dexametasona suprime a expressão da TIMP-1 em células MC3T3 e está associada à apoptose das células osteoblásticas, não estando associada à inibição das MMPs neste processo (Xie et al., 2010).

As MMP-1 e MMP-13 são conhecidas por serem secretadas por células osteogênicas (Partridge et al., 1996; Varghese et al., 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 et al., 1992; Lynch et al., 1995; Mizuno et al., 2000). Os efeitos exercidos pelo colágeno e mediados via sinalização pelas integrinas (Globus et al., 1995; Jikko et al., 1999; Reyes et al., 2004; Schneider et al., 2001; Xiao et al., 1998) ou pela apresentação apropriada de fatores estimulatórios das células (Aronow et al., 1990; Franceschi et al., 1992, 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; 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). Ensaios funcionais de superexpressão gênica e silenciamento gênico têm revelado importantes funções das MMPs/TIMPs/RECK. Em células de osteosarcoma (MG63) a superexpressão da MMP-1 diminui os níveis de BMP-2, Dlx2, ALP, osteopontina, sialoproteína óssea e aumenta os níveis de TGF-β1 e MSX2 e, o silenciamento gênico, aumenta todos os marcadores da diferenciação osteoblástica. Já a

superexpressão gênica da MMP-13 diminui os níveis de RUNX2, osteopontina, siloproteína óssea e aumenta os níveis de TGF-β1, osteocalcina e MSX2 e, o silenciamento gênico, aumenta os níveis de TGF-β1, MSX2, Osterix e diminui os níveis de RUNX2 e osteocalcina. Quando há duplo silenciamento gênico, há aumento de todos os marcadores osteoblásticos, com exceção de RUNX2 (Hayami et al., 2011). Assim, nossos dados revelaram que ambas as MMP-1 e MMP-13 foram reguladas negativamente ao longo da indução da diferenciação osteogênica, corroborando com a literatura, isto sendo importante para a correta sequência de diferenciação a partir de MSCs.

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

Ensaios funcionais para as MMPs/TIMPs/RECK foram conduzidos por poucos estudos em MSCs. O silenciamento gênico da TIMP-1 em BMSCs levou à diminuição da proliferação, atividade metabólica e diferenciação osteogênica via Wnt/β-catenina (Egea et al., 2012). O silenciamento gênico de RECK em BMSCs também levou à diminuição da diferenciação osteogênica, no entanto, estimulou a diferenciação adipogênica também pela via Wnt/β-catenina (Mahl et al., 2016). Nós verificamos alta expressão da TIMP-1 em DPSCs bem como altos níveis de transcritos ao longo da diferenciação osteoblástica em ambos os grupos experimentais, mas mais proeminente no grupo osteogênico. Também verificamos a expressão de RECK nas DPSCs, porém os resultados de expressão gênica não foram tão conclusivos.

Nosso grupo está realizando ensaios funcionais de superexpressão e silenciamento gênico nas DPSCs para as MMPs -2, -9 e -14, todas as TIMPs e RECK e esperamos ter resultados mais conclusivos.

7 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.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res. 2004 Aug 1; 64(15):5245-50.

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

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.

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.

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.

---

*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

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.

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.

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.

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, Kuliopulos 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, Ljujic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. Histol Histopathol. 2014 Jun; 29(6):699-706.

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.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Compston JE. Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. Bone. 1998 Jul; 23(1):7-12.

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.

Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. Mol Med Today. 1998 Mar; 4(3):130-7.

Cawston TE, Galloway WA, Mercer E, Murphy G, Reynolds JJ. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. Biochem J. 1981 Apr 1; 195(1):159-65.

Cawston TE, Rowan A. Prevention of cartilage breakdown by matrix metalloproteinase inhibition--a realistic therapeutic target? Br J Rheumatol. 1998 Apr; 37(4):353-6.

Chaussain C, Boukpessi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. Front Physiol. 2013 Nov 1;4:308.

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'addazio G, Artese L, Piccirilli M, Perfetti G. Role of matrix metalloproteinases in radicular cysts and periapical granulomas. Minerva Stomatol. 2014 Nov-Dec;63(11-12):411-20.

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.

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 Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, Md dS-V, 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.

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, 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 BC, Dell'Accio F, Vanlauwe 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.

Delaisse 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.

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.

Egea V, Zahler S, Rieth N, Neth P, Popp T, Kehe K, Jochum M, Ries C. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/β-catenin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 7;109(6):E309-16.

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.

Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, Sogayar MC. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. BMC Cancer. 2009 Jan 14;9:20.

Filanti C, Dickson GR, Di MD, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, et al. 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.

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.

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.

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

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.

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.

Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. Methods Mol Biol. 2011; 698:107-21.

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.

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.

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.

Hayami T, Kapila YL, Kapila S. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). Matrix Biol. 2011 May;30(4):281-9.

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.

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, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, et al. 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, 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.

Huang YL, Liu CJ, Chiu AW, Wang YC, Huan SK, Lee FL, et al. A feasible tool to detect mRNA expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human Tenon's capsule. Ophthalmic Res. 2002 Nov; 34(6):375-9.

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.

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.

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.

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.

Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin 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.

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.

Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, et al. 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.

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.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. 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.

Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. J Pediatr Surg. 2016 Jan; 51(1):8-12.

Ledesma-Martinez E, Mendoza-Nunez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. Stem Cells Int. 2016; 2016:4709572.

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.

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.

Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. J Cell Physiol. 2011 Feb;226(2):385-96.

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.

Mahl C, Egea V, Megens RT, Pitsch T, Santovito D, Weber C, Ries C. RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) regulates migration, differentiation and Wnt/β-catenin signaling in human mesenchymal stem cells. Cell Mol Life Sci. 2016 Apr;73(7):1489-501.

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, 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.

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.

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 (Pt 4):1093-9.

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, 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-intoregistraaumento- 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.

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.

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.

Morsczeck 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.

Paiva KB, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonca T, Taga R, Nunes FD, Sogayar MC, et al. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. J Mol Histol. 2009 Jun; 40(3):201-7.

Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjäderhane L. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. J Dent Res. 2002 May;81(5):354-9.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. Eur J Oral Sci. 2003 Apr;111(2):117-27.

Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. J Dent Res. 2000 Jan;79(1):77-84.

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

Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, et al. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics. Cytotherapy. 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.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1; 29(9):e45.

Philips N, Keller T, Holmes C. Reciprocal effects of ascorbate on cancer cell growth and the expression of matrix metalloproteinases and transforming growth 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.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.

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.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development. Ann N Y Acad Sci. 1994 Sep 6; 732:472-5.

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

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.

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.

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.

Ronziere MC, Roche S, Gouttenoire J, Demarteau 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.

Roth V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: http://www.doubling-time.com/compute.php

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

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.

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev. 2006 Feb;5(1):91-116.

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

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.

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, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. J Dent Res. 2002 Sep;81(9):603-7.

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

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.

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.

Tjäderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. Caries Res. 2015;49(3):193-208.

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.

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.

Tse JR, Engler AJ. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. PLoS One. 2011; 6(1):e15978.

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.

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

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.

Walter C, Frieden E. The prevalence and significance of the product inhibition of enzymes. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1963; 25:167-274.

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.

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.

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

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 M, Jiao T, Chen Y, Xu C, Li J, Jiang X, et al. EMMPRIN (basigin/CD147) is involved in the morphogenesis of tooth germ in mouse molars. Histochem Cell Biol. 2010 May; 133(5):585-94.

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.

Zeng ZS, Guillem JG. Unique activation of matrix metalloproteinase-9 within human liver metastasis from colorectal cancer. Br J Cancer. 1998 Aug; 78(3):349-53.

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.

Zvaifler 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.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ portador do RG n°. _____, residente a Rua (Av.) _____, n°._____, na cidade de _____, Estado _____, (responsável pelo(a) menor _____ _____)*, matriculado no HU com o n°. _____, concordo em participar na (autorizo sua participação na)* pesquisa de Título "**Superexpressão e Inibição gênica da MMP-14 em Células-tronco da Polpa Dentária Humana Semeadas em Biomaterial Colágeno-quitosana: Influência na Osteogênese in vitro e in vivo**", realizada pela aluna de Mestrado **Leticia Miquelitto Gasparoni**, sob orientação da **Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva (ICB/USP)**.

A referida pesquisa tem como objetivo:

- Avaliar se a alteração de alguns genes das células-tronco do dente (células com capacidade de se transformarem em vários tipos de células do corpo) pode melhorar a formação de osso.

E fui orientado(a) do seguinte:

- A polpa dentária será coletada após a remoção cirúrgica do dente;
- Por se tratar de sobra, não haverá risco ou malefício para a recuperação do paciente;
- Todos os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular (LabMec), não oferecendo qualquer risco ao paciente;
- A coleta da sobra ocorrerá uma única vez por procedimento cirúrgico (extração terceiro molar ou outro dente);
- Os dados pessoais e clínicos dos pacientes triados para esta pesquisa serão mantidos em sigilo.

Estou ciente também de que minha (sua) participação é voluntária e dela posso desistir a qualquer momento, sem explicar os motivos e sem comprometer meu tratamento no HU.

São Paulo, _____ de _____, 2016.

_____ _____

Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva Assinatura do Paciente (Responsável)*

*Em caso de menor de idade (menor de 21 anos)

Nome do Pesquisador Responsável: Katiucia Batista da Silva Paiva (katipaiva@usp.br)
Endereço Institucional: Avenida Lineu Prestes, 2415 – ICB III – sala 107 (Instituto de Ciências Biomédicas/USP) **Cidade**: São Paulo **Estado**: SP **CEP**: 05508-000
Telefones: (011) 2648-8267 (Laboratório);
(011) 2648-8254 (Escritório)
(011) 97646-6244 (Celular)

Identificação CEP-ICB: Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – 05508-000 – Cidade Universitária – São Paulo/SP – Telefone: (011) 3091-7733 – cep@icb.usp.br

Identificação CEP-HU: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – 05508-000 – Cidade Universitária – São Paulo/SP – Telefone: (011) 3091-9457 – Fax: (011) 3091-9452 – e-mail: cep@hu.usp.br