

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

**RITA DE KÁSSIA XAVIER PEREIRA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEINASES EM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE RATO CULTIVADAS EM MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE  
COLÁGENO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

**RITA DE KÁSSIA XAVIER PEREIRA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEINASES EM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE RATO CULTIVADAS EM MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE  
COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Arthur Giraldi  
Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P436

Pereira, Rita de Kassia Xavier.

Expressão Gênica De Metaloproteinases Em Células-Tronco Mesenquimais De Rato Cultivadas Em Matriz Tridimensional De Colágeno. / Rita de Kassia Xavier Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

55 f. : il.

Bibliografia: 34 - 41.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.  
Orientador: Arthur Giraldi Guimaraes.

1. Células-Troco Mesenquimais. 2. Expressão Gênica. 3. Metaloproteinases. 4. Cultivo Celular. 5. Ambiente Tridimensional de Colágeno. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

**RITA DE KÁSSIA XAVIER PEREIRA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEINASES EM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE RATO CULTIVADAS EM MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE  
COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Arthur Giraldi  
Guimarães

Aprovada em: 30 / 04 / 2019

Comissão Examinadora:

*Renato DaMatta*

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta - LBCT/CBB/UENF

*Natália Deus de Oliveira Crespo*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália Deus de Oliveira Crespo – IFF Campos Centro

*Luciana Belarmino da Silva*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Belarmino da Silva – IFF Campos Centro

*Arthur Giraldi Guimarães*

Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães – LBCT/CBB/UENF

Dedico este trabalho a Deus que é o meu refúgio e  
fortaleza em todos os momentos.

Dedico também a minha família, em especial aos  
meus pais, José Carlos e Arani.

“ Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível ”. Charles Chaplin

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me desamparar e por ter me dado força, inteligência e sabedoria para que pudesse concluir esse projeto de pesquisa.

Agradeço aos meus pais, José Carlos e Arani, não apenas pela minha formação educacional, mas também pela minha formação como cidadã, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus direitos e a ter responsabilidade com os meus deveres. Agradeço ainda, aos meus irmãos Matheus e Kariny, por estarem sempre ao meu lado e pelo seu carinho. Obrigada aos meus avós Carlito e Almerinda, por seu amor e zelo. Aos meus avós Hugo e Maria da Penha, as minhas tias Adilma e Adir, que sempre estiveram presente em minha vida, me apoiando. Ainda aos meus primos e amigos que me alegram e motivam.

Agradeço também ao professor Arthur Giraldi Guimarães por me orientar, desde minha iniciação científica me ajudando a crescer como pesquisadora e a ser mais independente.

Sou ainda grata ao professor Renato DaMatta, por ceder espaço em seu laboratório, auxiliando quando necessário e também aos seus orientandos sempre muito companheiros.

Obrigada ao professor Jorge Hernandez Fernandez, que sempre esteve disponível quando precisei, com dicas valiosas para o meu crescimento.

Agradeço as técnicas do LBCT, que sempre muito solícitas me ajudaram sempre que necessitei, especialmente a Darly, Adriana e Rose e a técnica do biotério Joana, por sua disponibilidade.

Obrigada a Brunna Xavier por ter aceitado ser a revisora desse trabalho, por todas as dicas de ouro, por sua dedicação e empenho mesmo em um curto prazo para a melhoria desse projeto.

Obrigada aos membros avaliadores da banca, professores: Dr. Renato Augusto DaMatta, Dr<sup>a</sup>. Luciana Belarmindo da Silva e a Dr<sup>a</sup>. Natália Deus de Oliveira Crespo que aceitaram prontamente a avaliar esse trabalho.

Finalmente, agradeço à UENF, ao Centro de Biociências e Biotecnologia, a CAPES, a FAPERJ e ao CNPq que disponibilizaram a verba e espaço me dando oportunidade para que esse trabalho pudesse ser realizado. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste.



## RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTMs) são uma fonte promissora para o reparo de tecidos e da terapia celular. Para serem utilizadas, as células precisam ser cultivadas, sendo o protocolo padrão de cultivo realizado em ambiente bidimensional (2D), o que não reproduz satisfatoriamente a condição natural na medula óssea. O desenvolvimento de novos sistemas de cultura *in vitro* tridimensionais (3D) vêm sendo utilizado no sentido de mimetizar o ambiente natural das CTMs. Metaloproteinases são peptidases de um grupo de enzimas proteolíticas que tem papel importante no controle da homeostase da matriz extracelular e regulam a função de crescimento, divisão, morfogênese e apoptose celular. As metaloproteinases de matriz (MMPs) estão diretamente envolvidas na capacidade de células em migrar e alterar parênquimas, incluindo nas CTMs. O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a diferença nas condições de cultivo de CTMs murinas desencadeia variações na expressão de genes de metaloproteinases de matriz. Para isso, as CTMs foram extraídas da medula óssea de ratos e previamente purificadas e então cultivadas em padrão ou em 3D, estas dentro de uma matriz de colágeno. A partir do RNA extraído dessas células, foi sintetizado o cDNA do qual os genes de interesse foram amplificados por qPCR, utilizando primers específicos para 10 MMPs. Observamos pelos nossos resultados que as nossas células tinham um alto grau de purificação de acordo com sua morfologia característica e por apresentarem menos de 1% para os marcadores de superfície negativos e mais de 99% para os positivos. Concluímos ainda que o melhor gene de referência a ser utilizado foi o PGK1, obtendo um *fold change* mais próximo de 1. Dos 10 genes de MMPs analisados, dois deles, as MMPs 8 e 9 obtivemos resultados inconclusivos, e que sete deles as MMPs 2, 3, 13, 14, 15, 19 e 24 não observamos diferença significativa. Apenas o gene da MMP7 mostrou redução da expressão no grupo 3D. Essa metaloproteinase está envolvida nos processos fisiológicos do nosso organismo, como o remodelamento tecidual, cicatrização de feridas, indução de diferenciação das CTMs em condrócitos, adesão célula-célula e apoptose. Nossos resultados sugerem que o cultivo das CTMs em matriz de colágeno não promove significativa alteração na expressão de genes de MMPs, o que pode indicar que este cultivo não está promovendo alteração no potencial de invasividade e de diferenciação destas células.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a promising source for tissue repair and cell therapy. To be used, the cells need to be cultured, the standard culture protocol being performed in a 2D environment, which does not satisfactorily reproduce the natural condition in the bone marrow. The development of new three-dimensional in vitro (3D) culture systems has been used to mimic the natural environment of CTMs. Metalloproteinases are peptidases of a group of proteolytic enzymes that play an important role in controlling the homeostasis of the extracellular matrix and regulate the function of growth, division, morphogenesis and cellular apoptosis. Matrix metalloproteinases (MMPs) are directly involved in the ability of cells to migrate and alter parenchyma, including in MSCs. The overall objective of this work was to investigate whether the difference in the culture conditions of murine CTMs elicits variations in the expression of matrix metalloproteinase genes. To that end, CTMs were extracted from the bone marrow of rats and previously purified and then cultured in standard or 3D, within a collagen matrix. From the RNA extracted from these cells, the cDNA from which the genes of interest were amplified by qPCR, using specific primers for 10 MMPs, was synthesized. We observed from our results that our cells had a high degree of purification according to their characteristic morphology and presented less than 1% for negative surface markers and more than 99% for positive ones. We concluded that the best reference gene to be used was PGK1, obtaining a fold change closer to 1. Of the 10 MMP genes analyzed, two of them, MMPs 8 and 9 obtained inconclusive results, and seven of them MMPs 2, 3, 13, 14, 15, 19 and 24 showed no significant difference. Only the MMP7 gene showed reduced expression in the 3D group. This metalloproteinase is involved in the physiological processes of our organism, such as tissue remodeling, wound healing, induction of differentiation of MSCs in chondrocytes, cell-cell adhesion and apoptosis. Our results suggest that the culture of collagen matrix CTMs does not promote significant alteration in the expression of MMPs genes, which may indicate that this culture is not promoting changes in the invasiveness and differentiation potential of these cells.

## I. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS:

**FIGURA 1: As propriedades das Células Tronco Mesenquimais (CTMs).** Isolamento, expansão e diferenciação de CTMs. Adaptado de CHEN *et al.*, 2016.....2

**FIGURA 2: Propriedades reparadoras de tecidos de CTMs.** Processo inflamatório, recrutamento de células, regeneração e reparo tecidual. Adaptado de MA *et al.*, 2014.....5

**FIGURA 3: Figura 3. Propriedades imunossupressoras de CTMs.** Infiltração de células imunológicas e CTMs. Adaptado de MA *et al.*, 2014.....6

**FIGURA 4: Modelo proposto da interação entre CTMs e respostas imunes durante o reparo tecidual.** Regulação negativa das respostas imunes mediada por altos níveis de quimiocinas e fatores inibitórios imunológicos, na inflamação aguda. Adaptado de MA *et al.*, 2014.....7

**FIGURA 5: Estrutura de domínio de MMPs.** S, sinal do peptídeo; Pro, pro peptídeo; Cat, domínio catalítico; Zn, sitio ativo do zinco; Hpx, domínio de hemopexina; Fn, domínio da fibronectina; V, inserção de vitronectina; I, domínio transmembranar do tipo I; II, domínio transmembranar do tipo II; G, âncora GPI; Cp, domínio citoplasmático; Ca, região da matriz de cisteína; Ig, domínio semelhante a IgG. Um local de clivagem de furina é representado como uma banda preta entre o propeptídeo e o domínio catalítico. Adaptado de: (VISSE; NAGASE, 2003).....10

**FIGURA 6. Análise da expressão de marcadores de superfície nas CTMs por citometria de fluxo.** A linha mais clara indica os controles de isoforma, enquanto a

linha escura indica os marcadores específicos. Marcadores positivos: CD29 e CD90, marcadores negativos: CD11b e CD45.....22

**FIGURA 7. Análise da expressão de genes de referência.** Os pontos com as barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). B2M, p = 0,4; ACTB, p = 0,1; PGK1, p = 0,5; GAPDH, p = 0,1; GUSB, p = 0,3; PPIA, p = 0,2; teste t.....24

**FIGURA 8. Análise comparativa da expressão de MMPs nas condições 2D e 3D.** (\*\*\*) = p < 0,001; one-sample t test). Os pontos com as barras de erro representam a média  $\pm$  S.E.M. (n = 3). MMP2, p = 0,4; MMP3, p = 0,4; MMP13, p = 0,4; MMP14, p = 0,6; MMP15, p = 0,8; MMP19, p = 1,0; MMP24, p = 0,6; one-sample t test..... 25

**TABELA 1: Classificação e Funções das MMPs.....11**

**TABELA 2: Relação de genes de referência analisados .....19**

**TABELA 3: Relação dos genes de interesse analisados .....20**

**TABELA 4: Panorama Experimental da Expressão Gênica de MMPs em CTMs Submetidas ao Cultivo 2D e 3D.....26**

## II. ABREVIATURAS:

- ❖ AGE – Produtos finais de glicação avançada (do inglês: *Advanced Glycation End-Products*)
- ❖ 2D - Bidimensional
- ❖ 3D – Tridimensional
- ❖ CD – *Cluster of Differentiation*
- ❖ CDH2 - Caderina-2
- ❖ cDNA – DNA complementar
- ❖ CEUA – Comissão de Ética de Uso de Animais
- ❖ CMMOs – Células mesenquimais de medula óssea
- ❖ CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono
- ❖ C<sub>T</sub> – Cycle Threshold
- ❖ CTMs – Células-tronco mesenquimais
- ❖ DMEM/F12 – Meio de cultura celular Dulbecco e mistura de nutrientes Ham F12 (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- ❖ DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ❖ EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ❖ HGF – Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: *Hepatocyte growth factor*)
- ❖ HKGs – Genes de referência (do inglês: *Housekeeping Gene*)
- ❖ ICAM – Moléculas de adesão intracelular (do inglês: *intercellular adhesion molecule*)
- ❖ IFN- $\gamma$  - Interferon gama
- ❖ IgG – Imunoglobulina G
- ❖ IL-1 - Interleucina 1
- ❖ LPS - Lipopolissacarídeo
- ❖ MEC – Matriz Extracelular

- ❖ MMP – Metaloproteinase de Matriz
- ❖ mRNA – RNA mensageiro
- ❖ MT-MMP – Metaloproteinase de matriz tipo membrana
- ❖ NaOH - Hidróxido de sódio
- ❖ PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês: *phosphate buffered saline*)
- ❖ PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)
- ❖ qPCR – PCR quantitativo
- ❖ RNA – Ácido ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic acid*)
- ❖ RQ – Quantificação Relativa (do inglês: *relative quantification*)
- ❖ TNF-  $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: *tumor necrosis factor alfa*)
- ❖ TGF-  $\beta$  – Fator de crescimento de transformação beta (do inglês: *Transforming Growth Factor beta*)
- ❖ TIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
- ❖ VCAM – Molécula de adesão vascular celular (do inglês: *vascular cellular adhesion molecule*)

# Sumário

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
I. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS: .....	vii
II. ABREVIATURAS:.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) .....	1
1.2. Cultivo Celular de CTMs.....	7
1.3. Metaloproteinases da Matriz (MMPs) .....	9
2. OBJETIVO.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Modelo animal .....	18
3.2. Obtenção e Cultivo das CTMs.....	18
3.3. Análise Fenotípica .....	19
3.4. Cultivo Bidimensional e Tridimensional de CTMs.....	20
3.5. Extração do RNA total e Síntese do cDNA.....	20
3.6. Análise da Expressão de Genes .....	21
3.6.1 Análise dos Genes de Controle Endógeno.....	22
3.6.2 Análise dos Genes de Interesse .....	23
3.7. Análise Estatística .....	24
4. RESULTADOS .....	25
4.1. Caracterização Fenotípica das CTMs.....	25
4.2. Análise da Expressão Gênica .....	26
4.2.1. Análise dos Genes de Referência .....	26
4.2.2. Análise da Expressão dos Genes de Interesse .....	27
5. DISCUSSÃO .....	29
5.1. Considerações Iniciais.....	29
5.2. Expressão dos Genes de Referência .....	30
5.3. Expressão das Metaloproteinases.....	31
6. CONCLUSÕES .....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

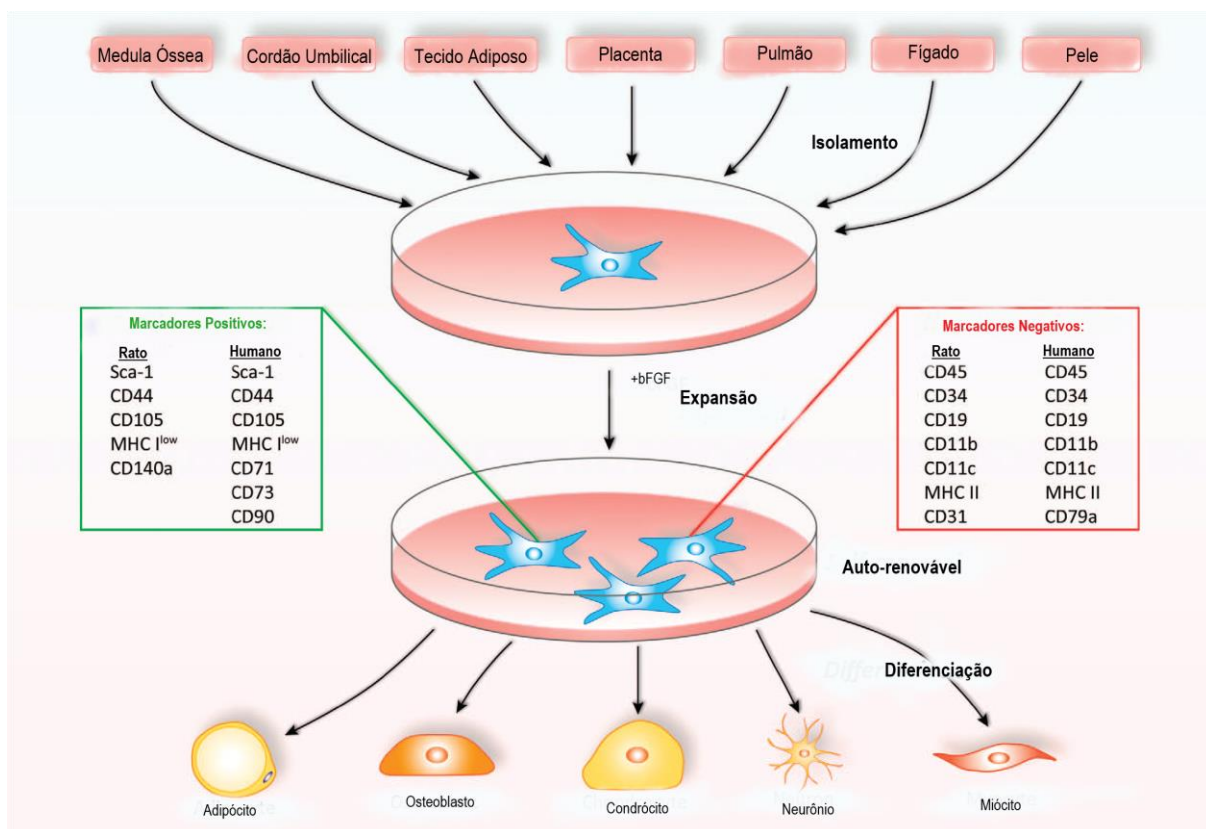
As células-tronco mesenquimais (CTMs), podem ser derivadas de diferentes fontes: da medula óssea de mamíferos, do cordão umbilical, do tecido adiposo, entre outros, têm a capacidade de se autorrenovar e crescer indefinidamente, mantendo sua multipotência, podendo se diferenciar em diversos tipos de tecidos de origem mesodermal. Estudos recentes revelam a capacidade das células mesenquimais de se diferenciarem também em tipos celulares diferentes do tecido de origem, como hepatócitos, células neurais e cardiomiócitos (ULLAH, SUBBARAO e RHO, 2015). Além disso, as CTMs possuem propriedades imunomodulatórias e funções reparadoras que acionam outras células para ajudarem no processo de reparação e remodelamento de tecidos (PITTENGER *et al.*, 1999). Essas propriedades permitem que essas células possam ser úteis na detecção de doenças e para o tratamento de seus pacientes, principalmente para terapias gênicas, transplantes e regeneração de tecidos (FERRARI *et al.*, 1998; THOMSON *et al.*, 1998; PITTENGER *et al.*, 1999; SCHWARZ *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que as CTMs são capazes de secretar uma série de moléculas bioativas (ROSE *et al.*, 2008) e também participar da homeostase celular, substituindo células mortas ou disfuncionais, contribuindo para o reparo dos tecidos e manutenção das funções (SANDERS *et al.*, 2006). Sua facilidade de expansão em cultura e suas características imunológicas, como baixa imunoreatividade e propriedades imunossupressoras tornam as CTMs uma fonte promissora para o reparo de tecidos e terapia gênica como por exemplo, músculo cardíaco ( RYAN *et al.*, 2007; JACKSON *et al.*, 2001; ORLIC *et al.*, 2001a, 2001b; PITTENGER *et al.*, 1999) . Seu potencial clínico vem sendo demonstrado em diversos estudos como em doenças musculoesqueléticas de equinos, expansão e diferenciação de células derivados do tecido adiposo e enxertos em doenças crônicas e agudas (CHOUDHERY *et al.*, 2014; SIMON *et al.*, 2011; TAYLOR, SMITH e CLEGG, 2007).

Estas células tronco podem ser obtidas de fontes como medula óssea ou tecido adiposo e são definidas como um conjunto de células com morfologia



fibroblástoide, alta aderência ao plástico e expressão de antígenos de superfície específicos (LI *et al.*, 2015; BIANCO, ROBEY e SIMMONS, 2008). As CTMs podem ser isoladas e diferenciadas pela presença de marcadores celulares positivos para os antígenos CD44, CD71, CD73, CD90, CD105 e MHC I e ausência de outros CD45, CD34, CD11b, CD11c, CD19 e MHC II (DOMINICI *et al.*, 2006; REICHLIN, 1969). Estas CTMs têm o potencial de se diferenciar em vários tipos diferentes de células, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, miócitos e neurônios (Figura 1) (CHEN *et al.*, 2016).



**Figura 1. As propriedades das Células Tronco Mesenquimais (CTMs).** Isolamento, expansão e diferenciação de CTMs. Adaptado de CHEN *et al.*, 2016.

As CTMs transplantadas em animais fetais ou neonatais, contribuem para a formação de vários tecidos diferentes, mesmo após o desenvolvimento da imunocompetência. Isso indica a migração dessas células para vários tecidos ao longo do corpo sem provocar uma resposta imune (LIECHTY *et al.*, 2000). Um grupo, ao injetar células CTMs no ventrículo lateral do cérebro de ratos de 3 dias de

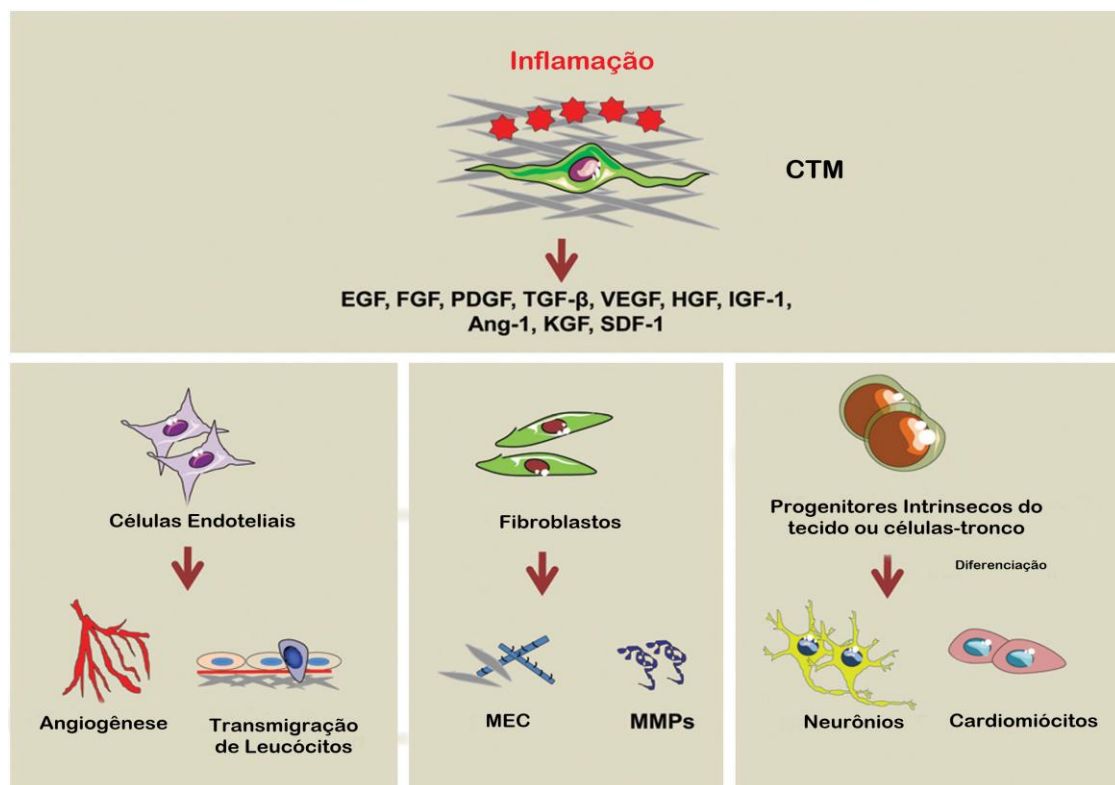
idade e examiná-los após 12 dias, descobriu que as células migraram através do prosencéfalo e do cerebelo, sugerindo que as CTMs imitam o comportamento das células progenitoras neurais. Algumas CTMs podem ter sido diferenciadas em astrócitos, e outras em neurônios (KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999). Os sinais de resposta no feto ou neonato são muito diferentes do animal adulto e, portanto, as CTMs podem ser capazes de se diferenciar em mais tipos de celulares no embrião do que no adulto (LIECHTY et al., 2000; KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999).

Achava-se que as CTMs só podiam se diferenciar em células do tecido de origem, porém, alguns estudos têm demonstrado que algumas delas podem se diferenciar em outras de linhagens diferentes do tecido original, como músculo, hepatócitos, miocárdio e células neurais por exemplo ( OGAWA, 2008; MORSHEAD *et al.*, 2002; JACKSON *et al.*, 2001; ORLIC *et al.*, 2001a; CLARKE *et al.*, 2000; KAWADA; LAGASSE *et al.*, 2000; SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; FERRARI *et al.*, 1998;). Essa capacidade de diferenciação das células tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrou que a mesma possui uma grande plasticidade, que é necessária para conectar células e adaptar diferentes tecidos durante o desenvolvimento dos órgãos. As CTMs podem ser ativadas e recrutadas para locais de danos nos tecidos, onde elas regeneram e reparam esses tecidos (HUNTER; ARSENAULT; HODSMAN, 1991). As funções reparadoras e as propriedades imunorreguladoras são induzidas por citocinas inflamatórias, os quais induzem células residentes e outras células locais a iniciarem o processo de reparação. Além disso, as propriedades imunomodulatórias das CTMs controlam as células do sistema imune, podendo inibir a atividade da via endossômica e a secreção de citocinas inflamatórias, essas atividades são desencadeadas pelo microambiente em que as células se encontram ( LUNDBERG *et al.*, 2000; HUNTER; ARSENAULT; HODSMAN, 1991).

Por causa de sua ampla distribuição tecidual, capacidade de diferenciação multipotente e efeitos bem estabelecidos em estudos pré-clínicos e clínicos, acredita-se que as CTMs tenham papel crítico na reparação de tecidos danificados (ULLAH, SUBBARAO e RHO, 2015). A lesão tecidual está associada à ativação de células imunológicas e inflamatórias. As moléculas inflamatórias e células imunes, juntamente com células endoteliais e fibroblastos, orquestram alterações no microambiente que resultam na mobilização e diferenciação de CTMs na medula e /

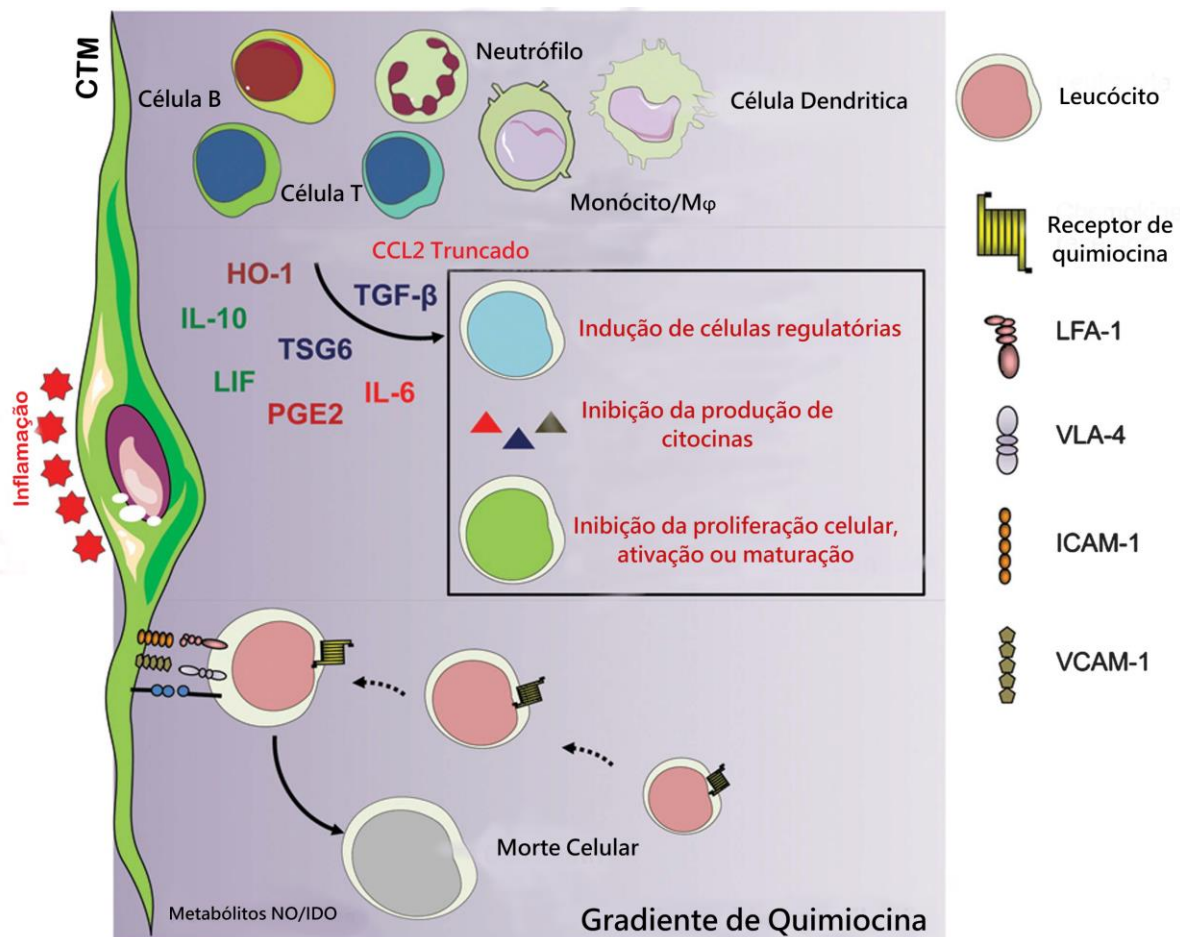
ou substituição de células teciduais danificadas. Estas CTMs podem ser residentes em tecidos ou podem ser recrutadas a partir da medula óssea (MA *et al.*,2014).

Uma vez que as CTMs entram no microambiente de tecidos lesionados, depois de injetadas, diversos fatores, incluindo citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , toxinas de agentes infecciosos e hipóxia podem estimular a liberação de diversos fatores de crescimento por CTMs incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), a angiopoietina-1 (Ang-1), entre outros. Estes fatores de crescimento orquestram células endoteliais, fibroblastos e células-tronco para promover a regeneração e o reparo tecidual por meio do aumento da angiogênese, da inibição da transmigração de leucócitos e da diferenciação intrínseca de células progenitoras. (Figura 2) (MA *et al.*,2014).



**Figura 2. Propriedades reparadoras de tecidos de CTMs.** Processo inflamatório, recrutamento de células, regeneração e reparo tecidual. Adaptado de MA *et al.*, 2014.

O IFN- $\gamma$  em combinação com citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ , pode estimular CTMs a induzir níveis muito altos de fatores imunossupressores, bem como uma explosão de expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, incluindo a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). Sua ação conjunta leva a um acúmulo de células imunes nas proximidades de CTMs, induzindo um microambiente em que os efeitos dos fatores de ação local produzidos pelas CTMs são amplificados e levam a uma forte imunossupressão como pode ser observado na figura 3 (MA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2016).



**Figura 3. Propriedades imunossupressoras de CTMs.** Infiltração de células imunológicas e CTMs. Produção de altos níveis de quimiocinas e moléculas de adesão. Acúmulo de células imunes, altas concentrações de óxido nítrico (em CTMs murinas) ou depleção de triptofano (em CTMs humanas) levando à inibição de células imunes. Outros fatores imunossupressores, também podem afetar a ativação, a proliferação e as funções da célula imune. Adaptado de MA *et al.*, 2014.

As evidências indicam que as CTMs podem promover respostas imunes contrárias na presença de baixos ou altos níveis de inflamação, indicando a plasticidade das funções imunorreguladoras. Quando a inflamação é baixa ou a expressão dos fatores imunossupressores mencionados é inibida, as CTMs poderiam promover dramaticamente respostas imunes como demonstrado na figura 4 (MA *et al.*, 2014;).

Essas evidências sugerem o grande potencial das CTMs para serem utilizadas em transplantes, promovendo regeneração dos tecidos, de células neurais, entre outros. Uma vez que a lesão tecidual ocorre, as CTMs são mobilizadas. A inflamação vigorosa permite que elas possuam a capacidade de regular negativamente as respostas imunes, um processo mediado por altos níveis de quimiocinas e fatores inibitórios imunológicos. Além disso, fatores de crescimento também são liberados pelas CTM, que induzindo células endoteliais e células tronco mesenquimais a reparar lesões. Citocinas inflamatórias insuficientes durante sítios inflamatórios crônicos, no entanto, poderiam estimular as CTM a produzir quimiocinas e fatores tróficos em sua ausência, levando as CTMs a prolongar a recuperação da doença, ou piorá-la na inflamação crônica (MA *et al.*, 2014).

A facilidade como são obtidas e a simplicidade dos procedimentos para sua cultura e expansão *in vitro* tornaram as CTMs ideais para terapias do sistema nervoso, no qual anteriormente era necessário colher células neurais autólogas, o que era um procedimento complicado (SCHWARZ *et al.*, 1999; SQUILLARO, PELUSO, GALDERISI, 2016). Um estudo foi abordado por Kim e colaboradores observando uma melhora dos sintomas parkinsonianos em ratos que receberam células-tronco embrionárias neurais. (KIM *et al.*, 2002).

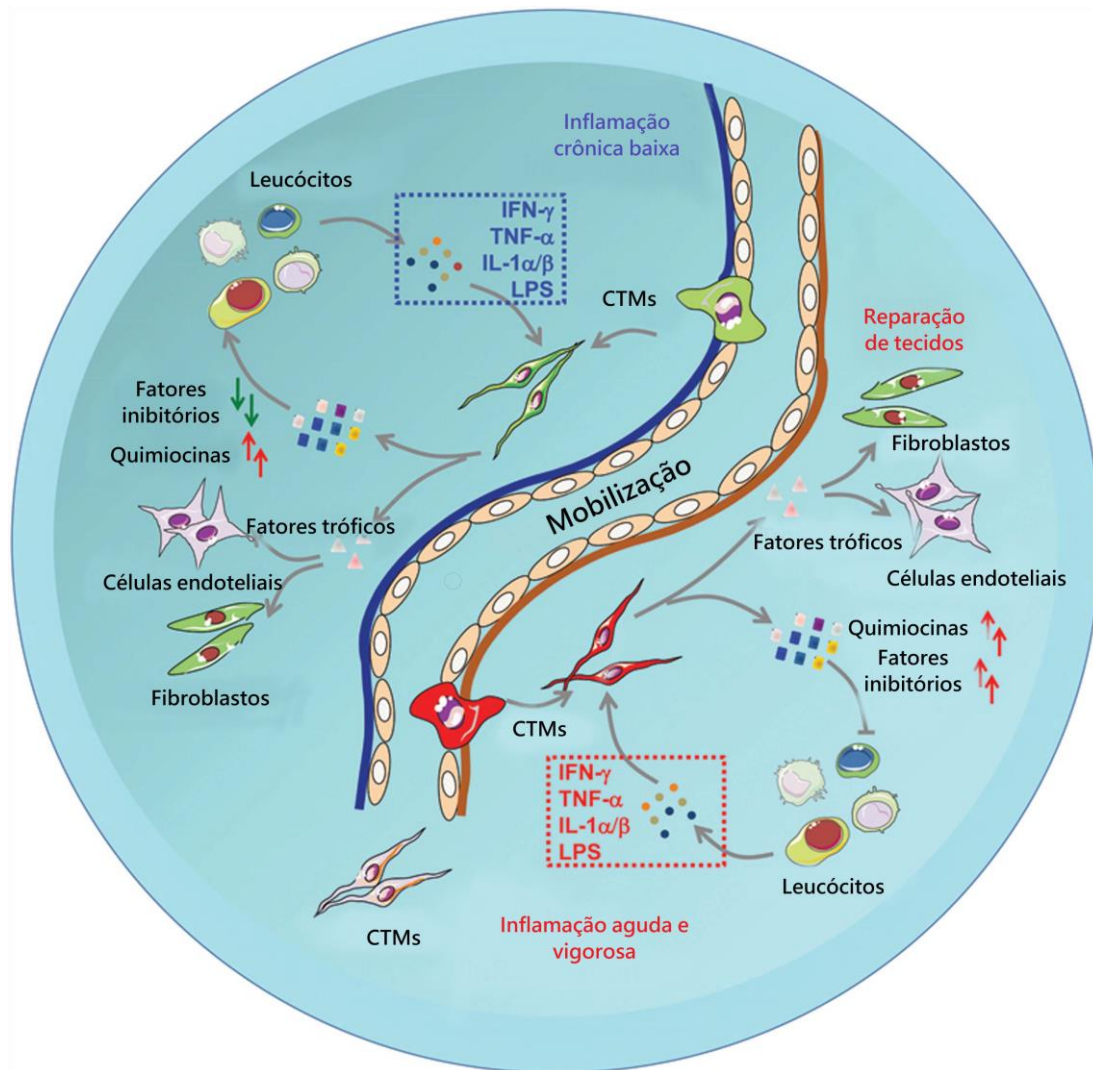


Figura 4. **Modelo proposto da interação entre CTMs e respostas imunes durante o reparo tecidual.** Regulação negativa das respostas imunes mediada por altos níveis de quimiocinas e fatores inibitórios imunológicos, na inflamação aguda. Reparação de lesões por fatores de crescimento. Estimulação da produção de quimiocinas e fatores tróficos na ausência de fatores inibitórios imunes suficientes na inflamação crônica levando prolongação da recuperação da doença, ou até sua piora. Adaptado de MA *et al.*, 2014.

## 1.2. Cultivo Celular de CTMs

Já foi comprovado em vários estudos que o microambiente interfere nas propriedades celulares, influenciando o genótipo e fenótipo de CTMs. Sabe-se que o modelo de cultivo bidimensional, que é tradicional, não fornece propriedades físicas suficientes para o crescimento das células, sendo necessário um modelo alternativo.

O modelo tridimensional mimetiza as condições celulares de crescimento no organismo, tornando mais próximo possível das condições nativas (SCAGLIONE *et al.*, 2006).

As CTMs podem ser cultivadas em uma malha de colágeno, tornando possível a melhor compreensão das interações e funções celulares ( STEFFENS E PRANKE, 2017; BARA *et al.*, 2014; DI MAGGIO *et al.*, 2011; SCAGLIONE *et al.*, 2006). As CTMs de medula-óssea devem ser cultivadas para que possam alcançar uma quantidade maior de células antes de serem administradas no organismo visando o tratamento. Estas células representam apenas 0,001-0,01% do total de células retiradas da medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos sobre o cultivo de CTMs têm demonstrado como as alterações micro ambientais podem influenciar o fenótipo celular ( LIU *et al.*, 2019; AUGELLO; KURTH; DE BARI, 2010; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008), descrevendo as interações de células-tronco na medula óssea (ISERN; MENDEZ-FERRER, 2011; MENDEZ-FERRER, 2010) e exploraram as propriedades imunomoduladoras dessas células. Como não existe uma padronização nos protocolos de isolamento e expansão de cultura para CTMs, há uma grande variação na forma como essas células são cultivadas entre diversos grupos. Geralmente usa-se a centrifugação de densidade para separar a fração mesenquimal dos outros constituintes da medula. Depois as células são semeadas em frascos para cultura de tecidos e as CTMs representam a população celular aderente ao plástico, devido sua morfologia fibroblastóide (LI *et al.*, 2015).

A forma como são extraídas da medula, a escolha do meio de densidade, as etapas de lavagem e centrifugação, a duração da fixação celular e o tipo de meio / soro desempenham um papel importante na formação do fenótipo que pode afetar seu potencial terapêutico (SCHÄCHINGER *et al.*, 2006). Muitos estudos revelam mudanças na expressão de genes associados ao ciclo celular, replicação e reparo do DNA, ocorrem imediatamente após o isolamento e são continuamente adquiridas durante a cultura (WAGNER *et al.*, 2008). Sabe-se ainda que se as células forem cultivadas durante muito tempo, podem perder sua multipotência e capacidade de diferenciação ( WAGNER *et al.*, 2008; BANFI *et al.*, 2002; BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1997).

Assim, as células expandidas no modelo bidimensional (2D) não representam o ambiente original das CTMs da medula óssea. O tipo de meio de cultura e o uso de suplementos afetam claramente o genótipo e o fenótipo da CTM e devem ser considerados ao selecionar condições ideais de cultivo (DI MAGGIO *et al.*, 2011). Assim, para o uso de terapias com CTMs, tornou-se necessário o desenvolvimento de novos sistemas de cultura *in vitro* tridimensionais (3D) e vários grupos vêm demonstrando as vantagens desse sistema de cultivo em tratamento de infarto de miocárdio, modelos isquêmicos e diabéticos (SANTOS *et al.*, 2015; SART *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2011; IWASE *et al.*, 2005). Nesse sistema 3D podem ser utilizados géis de colágeno tipo I, permitindo caracterizar melhor as CTMs e determinar como elas podem ser manipuladas bioquimicamente e geneticamente para aumentar sua eficácia terapêutica, além de melhorar a compreensão das CTMs mimetizadas em seu ambiente nativo. Além disso, o cultivo 3D permite estudar suas interações com outras células e moléculas da medula óssea e os aspectos de seu comportamento como a proliferação, a diferenciação e a capacidade migratória. (BARA *et al.*, 2014). Devido à complexidade do sistema de cultivo é necessária para permitir entender as funções intrínsecas e propriedades reparadoras dessas células (CLAROS *et al.*, 2012).

### **1.3. Metaloproteinases da Matriz (MMPs)**

As metaloproteinases de matriz (MMPs), são proteinases com um sítio ativo geralmente contendo zinco, capazes de degradar e digerir componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno, laminina, fibronectina entre outros. (HOOPER, 1994). Essas proteinases são classificadas de acordo com o substrato em que atua e participam diretamente do controle da homeostase da MEC, controlando o crescimento, divisão e funções de diversas células. A quantidade expressa de MMPs nos tecidos varia e é controlada de acordo com a necessidade do organismo. Citocinas e fatores de crescimento induzem ou inibem sua produção, além dos inibidores específicos de MMPs (TIMPs) que também atuam inativando-as quando sua ação não é necessária (BREW, 2000; SOLOMONOV *et al.*, 2016; SPINALE, 2002; STERNLICHT; WERB, 2009).



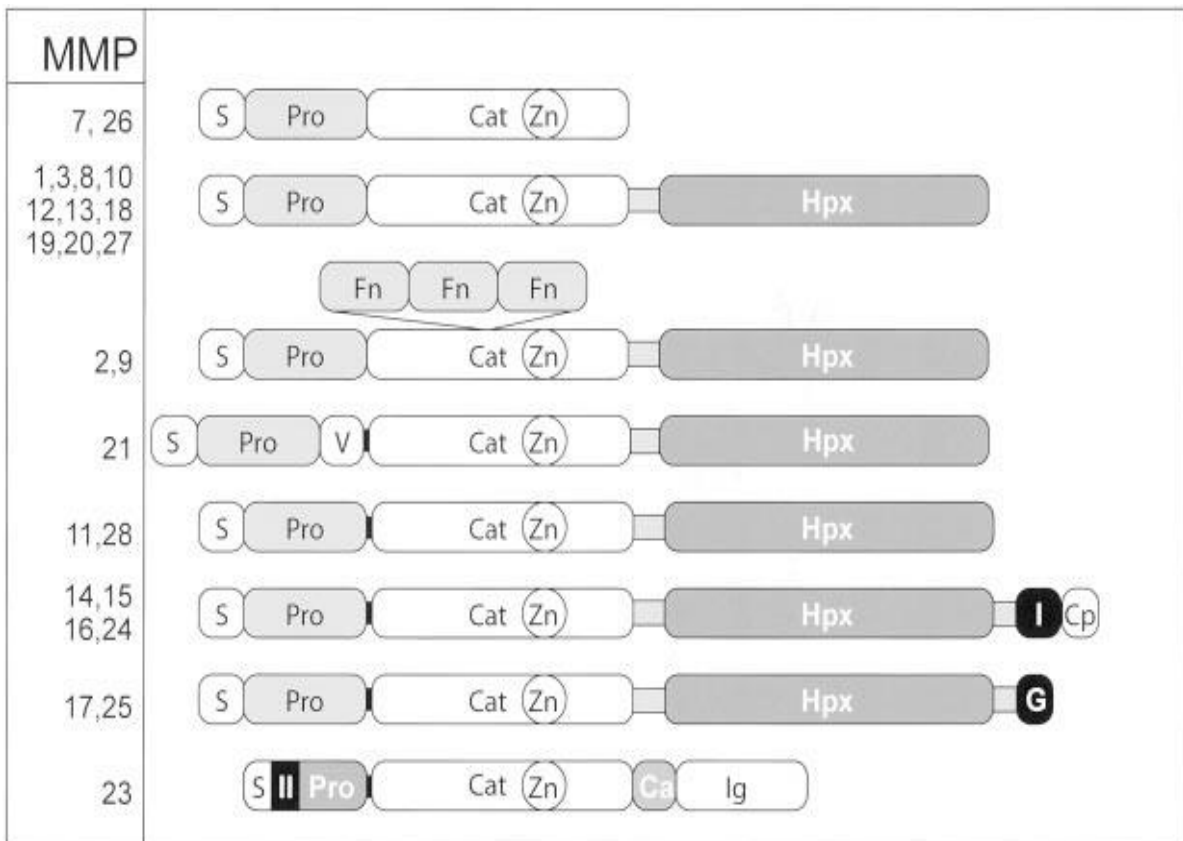
As macromoléculas de matriz extracelular são importantes para criar o ambiente necessário durante o desenvolvimento e a morfogênese das células. São essas moléculas que desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos, como embriogênese, remodelação dos tecidos, cicatrização de feridas e angiogênese. Sua principal função é a manutenção e remodelamento da arquitetura tecidual (NAGASE; WOESSNER, 1999; SPINALE, 2002; STERNLICHT; WERB, 2009).

Já foram identificados mais de 23 genes de MMPs em seres humanos, que podem ser divididos em vários grupos, de acordo com a especificidade do substrato, semelhança de sequência e organização do domínio, como pode ser observado na tabela 1 (VISSE; NAGASE, 2003). As MMPs geralmente possuem de um pró-domínio, um domínio catalítico, uma região móvel e um domínio de hemopexina como demonstrado na figura 5. Elas são secretadas da célula ou estão ancoradas à membrana plasmática (VISSE; NAGASE, 2003).

Contêm uma região de cisteína conservada, que mantém o zimogênio inativo, o pró-peptídeo. Um substrato liga-se à fenda do sítio catalítico da esquerda para a direita em relação aos seus terminais N e C, e o grupo carbonila da ligação peptídica coordena com o zinco no local ativo. Isso desloca a molécula de água do átomo de zinco. A hidrólise do peptídeo é auxiliada pelo grupo carboxila do glutamato, que serve como uma base geral para extrair um próton da molécula de água deslocada, facilitando assim o ataque nucleofílico da molécula de água no carbono carbonílico da ligação de fibra do peptídeo. Uma fenda à direita do zinco de sítio ativo, acomoda a cadeia lateral do resíduo do substrato, que se torna o novo terminal N após a clivagem. Algumas MMPs possuem regiões específicas como domínio de hemopexina, fibronectina e IgG que são importantes para estabelecer o sítio específico de ligação com o substrato (VISSE; NAGASE, 2003).

**Tabela 1:** Classificação e Funções das MMPs

Grupo	Exemplo	Função
Colagenases	MMP 1, MMP 8, MMP13 e MMP 18	<ul style="list-style-type: none"><li>- Separam colágenos intersticiais I, II e III</li><li>- Digerem moléculas presente na MEC</li></ul>
Gelatinases	MMP 2 e MMP 9	<ul style="list-style-type: none"><li>- Digerem colágenos desnaturados</li><li>- Capazes de se ligar e atacar gelatinas, colágenos, laminas e fibronectinas</li></ul>
Estromelisin as	MMP 3, MMP 10 e MMP 11	<ul style="list-style-type: none"><li>- Degradam colágenos tipos II, III, IV, IX e X</li><li>- Digerem componentes presente na MEC</li><li>- Ativam pró – MMPs</li></ul>
Matrilisinas	MMP 7 e MMP 26	<ul style="list-style-type: none"><li>- Digerem componentes presente na MEC</li><li>- Processam moléculas de superfície celular</li></ul>
Tipo Membranas	MMP 14, MMP 15, MMP 16, MMP 24, MMP 17, MMP 25 e MMP 23	<ul style="list-style-type: none"><li>- Com exceção da MMP 17, todas são capazes de ativar a pró – MMP 2</li><li>- Digerem uma série de moléculas da MEC</li><li>- MMP 14 tem atividade colagenolítica em colágenos do tipo I, II e III</li><li>- MMP 24 cliva parcialmente fibronectina, mas colágeno tipo I</li></ul>
Metaloelastin as	MMP 12, MMP 19	<ul style="list-style-type: none"><li>- Além da elastina, a MMP 12, digere outras proteínas</li><li>- MMP 19 degrada vários componentes da MEC, hidrolisa colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e gelatina tipo I</li></ul>
Enamelina	MMP 20	<ul style="list-style-type: none"><li>- Digere amelogenina</li></ul>



**Figura 5. Estrutura de domínio de MMPs.** S, sinal do peptídeo; Pro, pro peptídeo; Cat, domínio catalítico; Zn, sítio ativo do zinco; Hpx, domínio de hemopexina; Fn, domínio da fibronectina; V, inserção de vitronectina; I, domínio transmembranar do tipo I; II, domínio transmembranar do tipo II; G, âncora GPI; Cp, domínio citoplasmático; Ca, região da matriz de cisteína; Ig, domínio semelhante a IgG. Um local de clivagem de furina é representado como uma banda preta entre o propeptídeo e o domínio catalítico. Adaptado de: (VISSE; NAGASE, 2003).

As collagenases, como MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18 são caracterizadas por sua capacidade de separar os colágenos intersticiais I, II e III, podendo também digerir outras moléculas além das presente na MEC; Enquanto as gelatinases MMP-2 e MMP-9, digerem os colágenos desnaturados, chamados gelatinas. Possuem três repetições de um domínio de fibronectina de tipo II inserido no domínio catalítico, que se liga a gelatina, colágenos e laminina (ALLAN *et al.*; 1995; REN *et al.*, 2018). Já estromelina MMP-3 possui uma maior eficiência proteolítica do que a MMP-10. A MMP-11 é chamada de estromelina 3, mas possui sua sequência e especificidade ao substrato diferente das demais (SUZUKI *et al.*, 1990).

As matrilisinas MMP-7 e MMP-26, são caracterizadas pela falta de um domínio de hemopexina. Além dos componentes de MEC, a MMP-7 processa moléculas de superfície celular como pró- $\alpha$ - defensina, Fas-ligante, fator de necrose pró-tumoral (TNF) - $\alpha$  e E-caderina (URIA; LOPEZ-OTIN, 2000; VENTO *et al.*, 2018). Por sua vez, das MMPs tipo membrana (MT-MMPs): quatro são proteínas transmembranares do tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e duas são proteínas ancoradas com glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MMP- 17 e MMP-25). Com a exceção da MMP-17, todas elas são capazes de ativar a pró-MMP-2. Desempenham um papel importante na angiogênese. A MMP-24 é expressa principalmente no cerebelo (OHUCHI *et al.*, 1997; SEKINE-AIZAWA *et al.*, 2001). A MMP7 é uma metaloproteinase com ampla especificidade de substrato, capaz de degradar elastina, proteoglicanos, fibronectina e colágeno tipo IV. Também pode ser chamada matrilisina, foi descoberta por Woessner e Taplin no útero do rato em 1988 (CLARK, 2001). O DNA complementar (cDNA) da MMP7 humana foi isolado em 1988 por Muller e seus colaboradores (YOKOYAMA *et al.*, 2008). Além disso, pode clivar substratos da superfície celular, incluindo E-caderina, fator  $\alpha$ , fator de necrose tumoral e ligante FAS e possui um importante papel na transdução de sinal, adesão célula-célula e apoptose (HE *et al.*, 2018). Essa enzima é capaz de ativar outras pró-MMPs, como MMP2, MMP8 e MMP9, além de clivar e liberar outras importantes moléculas bioativas (KUMAR *et al.*, 2013).

A MMP-12 é chamada metaloelastina, é essencial para a migração de macrófagos. A MMP-19 foi identificada por clonagem de cDNA do fígado e como um auto antígeno derivado de células T de pacientes com artrite reumatoide. A enamelisina (MMP-20), que digere a amelogenina, está localizada principalmente no esmalte dentário recém-formado. A MMP-23, é expressa principalmente em tecidos reprodutivos e propõe-se que seja uma proteína de membrana tipo II que abriga o domínio transmembranar na parte N-terminal do pró-peptídeo. (KOLB *et al.*, 1997; PENDAS *et al.*, 1997; SHIPLEY *et al.*, 1996; VELASCO *et al.*, 1999).

A MMP2 e a MMP9 são detectadas principalmente no córtex e no cerebelo. A MMP9 também é detectada no hipocampo, sugerindo seu papel crítico na biologia neuronal (REMPE *et al.*, 2018; FUJIOKA *et al.*, 2012; ULRICH *et al.*, 2005; YONG,

2005). A ablação genética de MMPs específicas influencia a lesão e a patologia, portanto, media essencialmente distúrbios neuronais, incluindo aprendizagem e memória. Além disso, as MMPs provavelmente intercedem as modificações estruturais das espinhas dendríticas e também das estruturas de axônios / dendritos (ETHELL e ETHELL, 2007; HU *et al.*, 2007). Atacam especificamente o colágeno tipo IV, laminina e fibronectina, os principais componentes da lâmina basal em torno dos vasos sanguíneos cerebrais. Em modelos animais de isquemia cerebral, a expressão de MMP foi aumentada de forma significativa e foi relacionada à ruptura do sangue-cérebro e formação de edema vasogênico (ALLAN *et al.*, 1995).

A MMP3 é crucial na remodelação do tecido conjuntivo. Acredita-se também que a enzima esteja envolvida no reparo de feridas, na progressão da aterosclerose e no início do tumor (EGUCHI *et al.*, 2008; YE *et al.*, 1996).

A colagenase neutrofílica, também conhecida como MMP8, é uma enzima de clivagem do colágeno que está presente no tecido conjuntivo da maioria dos mamíferos. Doenças associadas à MMP8 incluem a ruptura prematura das membranas e gengivite. Entre suas vias relacionadas estão a Degradação da matriz extracelular. (JOHANSSON; AHONEN; KÄHÄRI, 2000).

A proteólise em diferentes locais da MMP24 resulta em múltiplas formas ativas da enzima com N terminais distintos. Esta proteína funciona na degradação de colágenos tipo I, II e III. Ao contrário da maioria das MMPs, que são secretadas, essa protease é um membro da subfamília MMP (MT-MMP) do tipo membrana, contém um domínio transmembrana e é expressa na superfície celular. Os substratos desta protease incluem as proteínas caderina 2 e a metalopeptidase de matriz 2 (também conhecida como colagenase tipo 72 de 72 kDa). Essa metaloprotease medeia a clivagem de N-caderina (CDH2) e atua como um regulador de interações neuroimunes e quiescência de células-tronco neurais. Envolvido em interações célula-célula entre neurites e mastócitos, possivelmente por mediação da clivagem de CDH2, atuando assim como um mediador da nocicepção térmica periférica e hiperalgesia inflamatória. Pode desempenhar um papel no crescimento axonal. (ELASTOLYTIC *et al.*, 1995).

Durante o desenvolvimento embrionário, a MMP13 é expressa no esqueleto como necessário para reestruturar a matriz de colágeno para a mineralização óssea.

Em situações patológicas, é altamente superexpresso. A proteína codificada por este gene cliva o colágeno tipo II mais eficientemente que os tipos I e III. Ela pode estar envolvida na rotatividade da cartilagem articular e na fisiopatologia da cartilagem associada à osteoartrite. Também pode funcionar ativando ou degradando as principais proteínas reguladoras, como TGF $\beta$ 1 e CTGF. Pode desempenhar um papel na migração celular e na invasão de células tumorais (JOHANSSON; AHONEN; KÄHÄRI, 2000).

Os déficits na MMP14 levam ao envelhecimento prematuro, ao tempo de vida curto e à senescência celular em camundongos, sugerindo um papel importante da MMP14 na remodelação da matriz extracelular durante o envelhecimento. Esta proteína ativa a proteína MMP2 e esta atividade pode estar envolvida na invasão de tumores. Doenças associadas à MMP14 incluem Síndrome de Winchester e Osteólise Multicêntrica, Nodulose e Artropatia. Entre suas vias relacionadas estão a adesão e a via AGE / RAGE. Endopeptidase que degrada vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno. Ativa pró-gelatinase A. Atua como um regulador positivo do crescimento e migração celular via ativação de MMP15 (SATO *et al.*, 1997).

Os membros dessa subfamília MMP15 podem ser ancorados à membrana extracelular por um domínio transmembrana ou pela ligação glicofosfatidilinositol, sugerindo que essas proteínas sejam expressas na superfície da célula e não secretadas em uma forma solúvel. Esta proteína pode desempenhar um papel na progressão do câncer. Doenças associadas à MMP15 incluem a dengue assintomática. Entre suas vias relacionadas estão a remodelação da adesão celular e a degradação da matriz extracelular (SATO *et al.*, 1997).

A proteína da MMP19 é expressa na epiderme humana e células endoteliais e tem um papel na proliferação celular, migração, angiogênese e adesão. Diversas variantes de transcrito que codificam isoformas distintas foram identificadas para esse gene. Doenças associadas à MMP19 incluem anomalias do disco óptico cavitário e periodontite. Entre suas vias relacionadas estão a Degradação da matriz extracelular e a via do GPCR. Degrada vários componentes da matriz extracelular, como a proteína de matriz oligomérica de agregano e cartilagem, durante o desenvolvimento, homeostase e condições patológicas (doença artrítica). Pode

também desempenhar um papel na neovascularização ou angiogênese. (NAGASE e WOESSNER, 1999; KOLB *et al.*, 1997).

As MMPs contribuem para ações fisiológicas que variam desde processamento de tecido durante embriogênese e desenvolvimento, morfogênese, sinalização e angiogênese para apoptose até ativação intestinal de proteína de defesa; mediando a degradação de diversos tecidos e controlando a homeostase tecidual. Portanto, são alvo de inibidores terapêuticos em muitas doenças inflamatórias, malignas e degenerativas (JOHNSON; DYER; HUPE, 1998).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em 2015 demonstrou a eficácia do tratamento de lesões no sistema nervoso, mais especificamente na terapia com CTMs em modelos isquêmicos. Os dados obtidos pela comparação dos resultados de diferentes tipos de cultivos: o ambiente tradicional bidimensional e o ambiente tridimensional demonstram-se com resultados positivos, nos quais pode ser observado uma melhora significativa em modelos animais murinos tratados com células mesenquimais em matriz de colágeno quando comparado a condição controle (DE FREITAS *et al.*, 2015). Desta forma, a motivação para esta pesquisa foi investigar se existe diferença entre a expressão dos genes relacionados as MMPs em CTMs sob as condições de cultivo 2D e 3D. Já foram realizados trabalhos em nosso grupo investigando outros tipos de genes, com os relacionados a integrinas, fatores de necrose tumoral, qyimiocinas e neurotrofinas, sob as mesmas condições de cultivo, obtendo um resultado satisfatório.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a diferença nas condições de cultivo de CTMs murinas desencadeia variações na expressão de genes de metaloproteinases de matriz.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Testar se há associação positiva e/ou negativa entre o cultivo bidimensional e a expressão de genes de MMPs.
- Testar se há associação positiva e/ou negativa entre o cultivo tridimensional e a expressão de genes de MMPs.
- Analisar as características fenotípicas das CTMs nos modelos de cultivo.
- Avaliar se a metodologia de cultivo interfere na expressão de genes de MMPs sob as duas condições de cultivo realizadas.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Modelo animal**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, de 2 a 3 meses de idade, obtidos do Biotério Central da UENF, que foram mantidos em condições-padrão de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminação (ciclo de 12h de luz, das 6-18h / 12h de escuro, das 18-6h), com água e alimentação disponíveis *ad libitum*. Os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Instituição (CEUA – UENF), sob o número de protocolo nº 86.

#### **3.2. Obtenção e Cultivo das CTMs**

Cinco ratos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Seus fêmures e suas tíbias foram removidos e dissecados. As quatro epífises dos ossos foram cortadas para liberar o acesso à medula óssea, inserindo uma seringa contendo o meio DMEM/F12, com o auxílio de uma agulha no interior do osso e seu conteúdo foi recolhido em tubos estéreis. As células obtidas da medula coletadas foram segregadas por centrifugação (5 minutos 400 x G). O sobrenadante foi descartado e o precipitado, recolhido. As células foram suspensas no mesmo meio (4 mL) e adicionado uma solução contendo polissacarose e diazoto de sódio (Histopaque 1.083 G mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) (4mL), em gradiente descontínuo de densidade, esse material foi novamente centrifugado (30 minutos a 400 x G). As células mononucleares são as que estão na interfase entre o Histopaque e o DEMEM/F12, foram retiradas e ressuspensas em meio DEMEM/F12 seguidas de nova centrifugação (5 min 400 x G). Esse processo de ressuspensão e centrifugação foi repetido três vezes, em 3mL de meio DEMEM/F12. Depois de passar pelo processo de purificação por 3 vezes, as células foram ressuspensas em 1mL de meio DEMEM/F12 e cultivadas em garrafas estéreis (75 cm<sup>2</sup>) com mais 9 mL de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina (100µg.mL<sup>-1</sup>), penicilina G (100U.mL<sup>-1</sup>), e neomicina (50µg.mL<sup>-1</sup>) e o antifúngico anforericina B (fungizona;

25 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) sempre nesta proporção em cada garrafa. A cultura foi mantida em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48h, o meio de cultivo contendo as células não aderidas foi descartado, as garrafas, lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e um novo meio DEMEN/F12 foi adicionado, juntamente com soro fetal bovino, antibiótico e fungizona nas proporções descritas anteriormente. A cultura foi mantida até que as CTMs atingissem confluência (cerca de 2 meses), e então, foram soltas por tripsinização, utilizando 4 mL de solução contendo 0,25% de tripsina e de EDTA (Gibco®), lavadas com PBS e replaqueadas de cada garrafa para outras duas. Esse processo foi repetido 3 vezes para alcançar um alto nível de purificação. Na última passagem as células foram soltas por tripsinização e suspensas em PBS. Para identificação das células viáveis e contagem por microscopia, foi utilizada a coloração com solução de 4% de azul de tripano, utilizando uma câmara de *Neubauer* e observado em microscópio invertido com iluminação de contraste de fase. Cada animal utilizado gerou uma cultura independente.

### 3.3. Análise Fenotípica

As células mesenquimais de medula óssea (CMMOs) que foram soltas da garrafa por tripsinização ficaram sob agitação durante duas horas. Posteriormente foram lavadas, contadas e isoladas em alíquotas de 2,5 x 10<sup>5</sup> células para cada anticorpo. Este material foi centrifugado (400 x G) e suspenso com PBS contendo 2% de soro fetal bovino + 0,1% de azida. Uma alíquota destas células foram incubadas com os anticorpos conjugados com fluoróforos para análise por citometria de fluxo contra os marcadores positivos para CTMs: anti-CD29/allophycocyanin (APC) conjugate (*hamster* IgG; 1:60; Molecular Probes) e anti-CD90/fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (mouse IgG1; 1:30; Abcam); negativos para CTMs: anti-CD45/phycoerythrin-cyanine 5.5 (PE-Cy5.5) conjugate (*mouse* IgG1; 1:60; Molecular Probes) e anti-CD11b/ phycoerythrin-cyanine 5 (PE-Cy5) conjugate (rat IgG2b; 1:60; Abcam) e também para controles de isoforma: hamster IgG/APC conjugate (Santa Cruz Biotechnology); *mouse* IgG1/FITC conjugate (Santa Cruz Biotechnology); *mouse* IgG1/PE-Cy5.5 conjugate (Molecular Probes) e *rat* IgG2b/PE-Cy5 conjugate (Santa Cruz Biotechnology).

Após a marcação, as células foram centrifugadas (400 x G, 20 minutos a 4°C) e suspensas com PBS contendo 2% de soro fetal bovino + 0,1% de azida. O processo foi repetido 3 vezes e então as células foram levadas para análise imunofenotípica em citômetro de fluxo (modelo FACSCalibur da BD Biosciences).

### **3.4. Cultivo Bidimensional e Tridimensional de CTMs**

As demais células, soltas da garrafa por tripsinização, foram contadas e replaqueadas em placas de 24 poços em uma densidade de  $10^6$  células por poço. Nos poços das placas, as células foram cultivadas em colágeno tipo I (cultivo 3D) ou aderidas ao fundo poço (cultivo 2D) e mantidas pelo período de 24 horas. No cultivo em 2D, as células foram mantidas em 2,5 ml de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino, antibiótico e fungicida.

No cultivo em 3D, para a síntese da matriz de colágeno foram utilizados 31  $\mu$ l de DMEM/F12 (5x), 25  $\mu$ l de NaOH 0.1 N, 44  $\mu$ l de DMEM/F12 (1x) com as células e 100  $\mu$ l de colágeno tipo I (3 mg/ml; Gibco, Invitrogen), somando um total de 200  $\mu$ l por poço. Depois de distribuídas nos poços das placas sob as diferentes condições de cultivo, as amostras foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora para a gelatinização da matriz de colágeno e após, foram adicionados 2,5 mL de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino, antibiótico e fungicida. Foram utilizados materiais de cinco culturas independentes, adquiridos de cinco animais diferentes, e cada cultura, forneceu os dois tipos de cultivo (2D ou 3D) que foram feitos em duplicata na placa.

### **3.5. Extração do RNA total e Síntese do cDNA**

Para a extração do RNA total das CTMs murinas cultivadas em condições 2D e 3D, utilizou-se o kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research), de acordo com o protocolo do fabricante. Os sobrenadantes de todos os poços foram retirados e descartados e as células nos poços cultivadas em 3D, foram congeladas em

nitrogênio líquido e maceradas antes do uso do kit. Após o isolamento do RNA total, foi sintetizado o cDNA, a partir do mesmo, utilizando o kit *Verso cDNA Synthesis* (Thermo Scientific), também de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi quantificado em fotoespectômetro (nanodrop) e diluído para concentração de 50 ng/ $\mu$ l.

### **3.6. Análise da Expressão de Genes**

Primeiramente, com o kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), seguindo as especificações do fabricante, foi realizado o PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Em cada poço da placa de 96 poços foi adicionado 6,3 $\mu$ l de *SYBR Green*, 2,7 $\mu$ l de água ultrapura, 1 $\mu$ l de primer (1 $\mu$ M) e 50 ng da amostra de cDNA sintetizado diluídos em 2 $\mu$ l de água ultrapura, com um total de 12 $\mu$ l por poço. Para as amostras submetidas a condição 2D como a 3D, foram realizadas em triplicata.

Para as leituras de fluorescência a cada ciclo de amplificação, foi utilizado o StepOnePlus™ (Applied Biosystems), e os dados foram analisados pelo programa StepOne Software v2.1. (Applied Biosystems). Os resultados foram expressos em valor de  $C_T$  (Cycle Threshold), que se refere ao número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente do marcador possa atingir o limiar de detecção estabelecido. Os valores de fluorescência emitidos no ciclo da reação de amplificação e o valor Threshold permite determinar o  $C_t$ , o momento do ciclo em que a fluorescência atingir o valor Threshold (detectável).

O kit personalizado GenOne Biotechnologies foi o utilizado para primers. O kit contém primers (6 genes de referência e 10 genes de MMPs) de interesse, que estão descritos nas tabelas 1 e 2. Sendo informado pelo fabricante que os primers têm entre 90 e 110% de eficiência, as sequências não foram fornecidas pelo fabricante.

### 3.6.1 Análise dos Genes de Controle Endógeno

Antes de analisarmos os genes de interesse, iniciamos uma análise da expressão de seis genes padrões constitutivos (housekeeping) utilizados como genes de referência para normatizar e reduzir possíveis erros gerados na quantificação da expressão de genes e selecionar o ideal para o controle endógeno nas diferentes condições de cultivo de CTMS. Posteriormente realizamos a análise dos genes de interesse das metaloproteinases de matriz nas duas condições de cultivo experimentais. Foi utilizado para analisar o nível de alteração (Fold Change) o cálculo do  $2^{-\Delta C_T}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000), de acordo com a fórmula:

Fold change (nível de alteração) =  $2^{-\Delta C_T} = 2^{-(C_T \text{ da condição experimental} - C_T \text{ da condição controle})}$ , sabendo que a condição experimental será o cultivo 3D e a controle o cultivo 2D. Este cálculo foi feito para cada gene em cada uma das cinco culturas.

Os genes analisados foram:

Tabela 2 – Relação de genes de referência analisados

<b>Abreviatura</b>	<b>Nome</b>
ACTB	Actina, beta (Beta-actina)
B2M	Beta-2 imunoglobulina
GAPDH	Gliceraldeido fosfato desidrogenase
GUSB	Beta Glucuronidase
PGK1	Fosfoglicerato quinase 1
PPIA	Peptidilprolil isomerase A

### 3.6.2 Análise dos Genes de Interesse

A expressão de 10 genes de interesse para MMPs, foram verificadas nas duas condições de cultivo (2D e 3D), empregando o cálculo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), seguindo a fórmula:

Fold change (nível de alteração) =  $2^{-\Delta C_T \text{ (condição experimental)} / 2^{-\Delta C_T \text{ (condição controle)}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Sabendo que  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ (condição experimental)} - \Delta C_T \text{ (condição controle)} = (C_T \text{ do gene de interesse na condição experimental} - C_T \text{ do gene de referência na condição experimental}) - (C_T \text{ do gene de interesse na condição controle} - C_T \text{ do gene de referência na condição controle})$ , onde a condição experimental foi o cultivo 3D e a controle o cultivo 2D. O cálculo do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  foi feito pareando as duas condições de cultivo em cada cultura, e cada uma teve seu respectivo valor de fold change para cada gene de interesse. Foram analisados os seguintes genes:

Tabela 3 – Relação dos genes de MMPs analisados

Abreviatura	Nome
MMP2	Metaloproteinase de Matriz 2
MMP3	Metaloproteinase de Matriz 3
MMP7	Metaloproteinase de Matriz 7
MMP8	Metaloproteinase de Matriz 8
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
MMP13	Metaloproteinase de Matriz 13
MMP14	Metaloproteinase de Matriz 14
MMP15	Metaloproteinase de Matriz 15
MMP19	Metaloproteinase de Matriz 19
MMP24	Metaloproteinase de Matriz 24

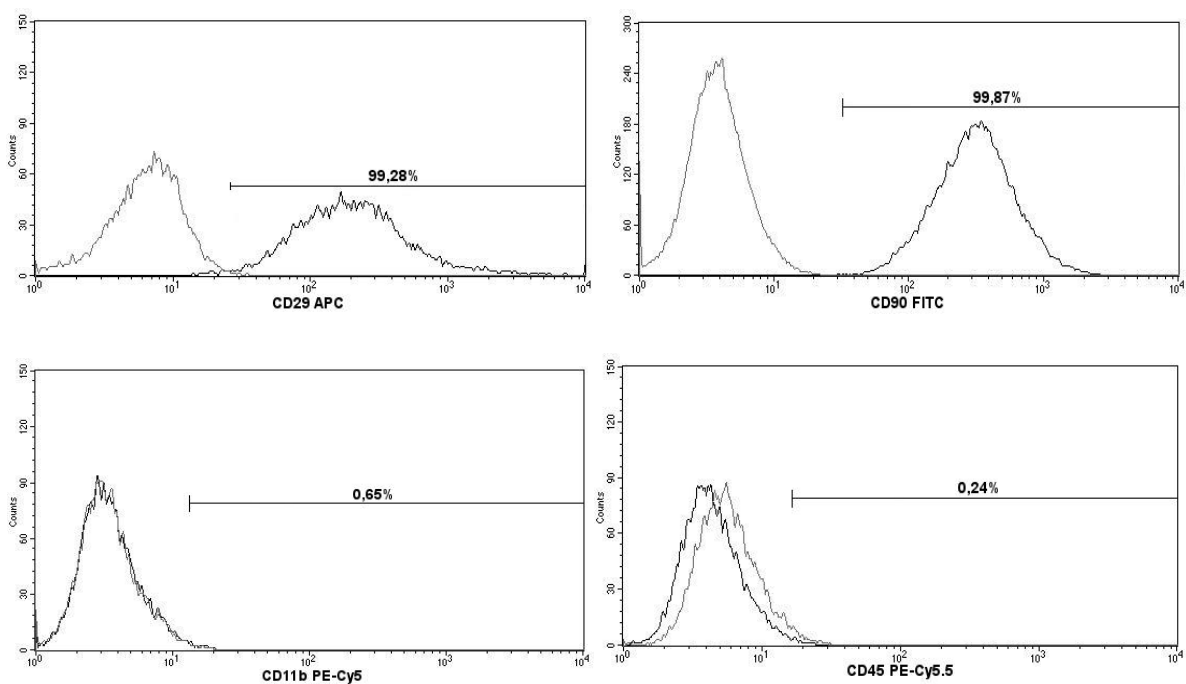
### 3.7. Análise Estatística

Através do programa StepOne v2.1, os dados obtidos foram exportados para uma planilha do EXCEL (Microsoft Windows), onde os cálculos de quantificação relativa (*Fold change*; nível de alteração) foram feitos para os genes de referência e para os genes de interesse, em cada condição experimental, através do teste *t*. A análise estatística e os gráficos foram montados no programa GraphPad Prism 4.02. Para as análises dos genes de referência e de expressão diferencial dos genes de interesse, a comparação da expressão de cada gene entre as condições 3D e 2D foi feita através do teste *t* pareado. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização Fenotípica das CTMs

Constatou-se que os marcadores positivos para as CTMs, CD29 e CD90 foram identificados em mais de 99% das células, enquanto os marcadores negativos CD45 e CD11b foram identificados em menos de 1% das células isoladas (Figura 6).



**Figura 6. Análise da expressão de marcadores de superfície nas CTMs por citometria de fluxo.** A linha mais clara indica os controles de isoforma, enquanto a linha escura indica os marcadores específicos. Marcadores positivos: CD29 e CD90, marcadores negativos: CD11b e CD45.

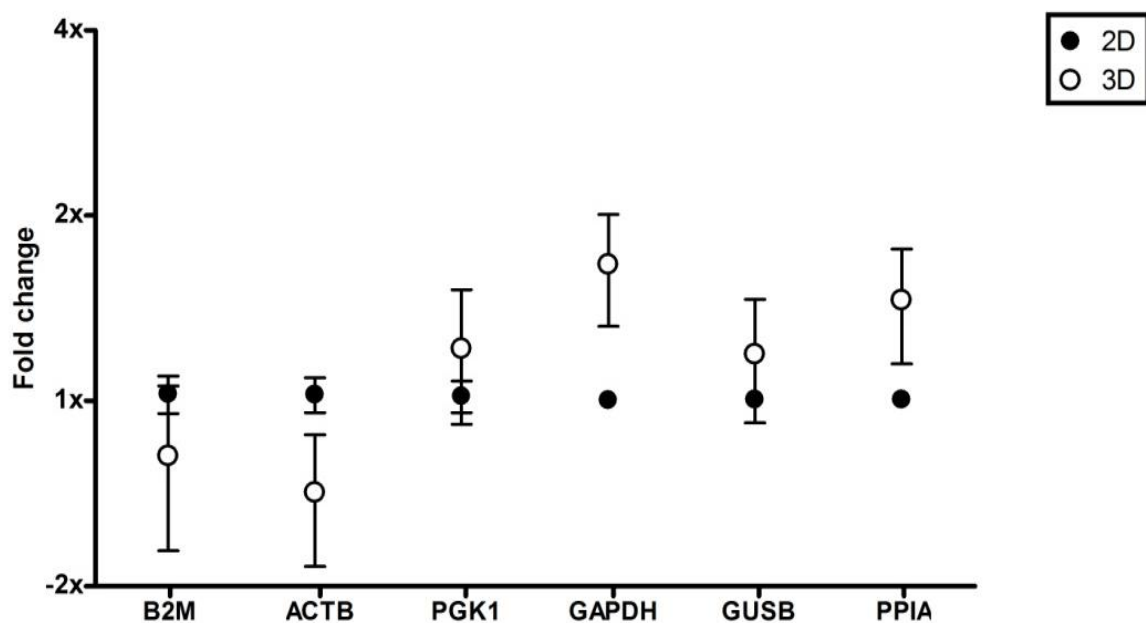
Outro resultado de caracterização fenotípica observado foi a análise microscópica das células isoladas apresentado morfologia semelhante a fibroblasto e sua alta aderência ao plástico.



## 4.2. Análise da Expressão Gênica

### 4.2.1. Análise dos Genes de Referência

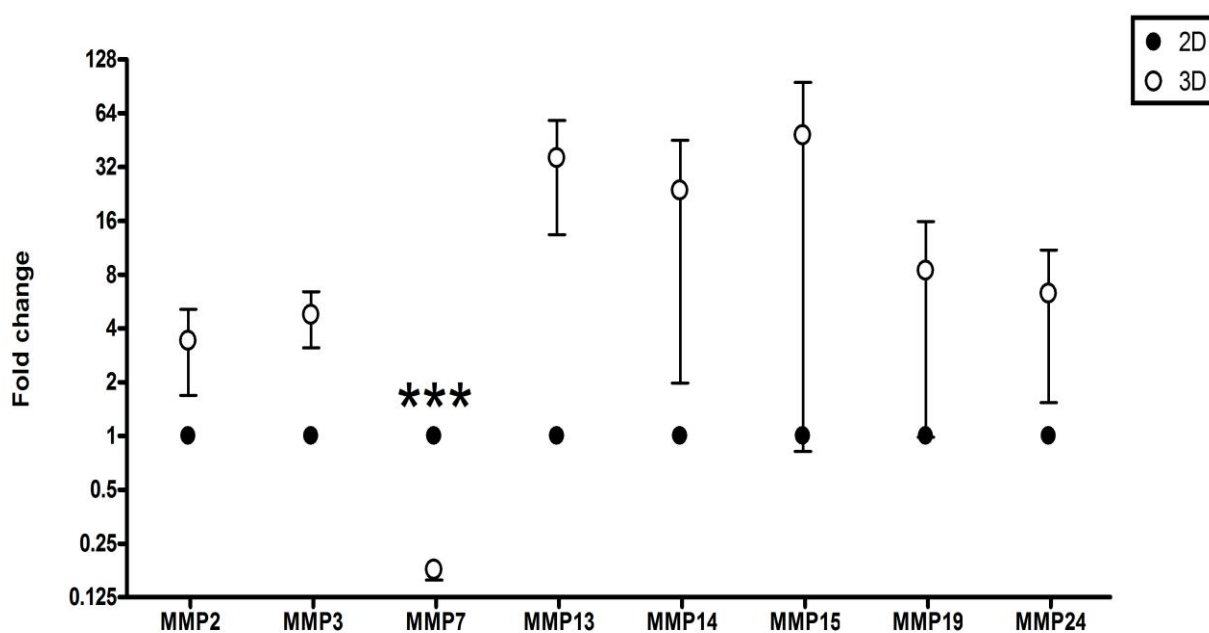
A análise da expressão de seis genes de referência (*housekeeping*) foi realizada para escolha do invariante, nas duas condições de cultivo (2D e 3D). Esses genes foram utilizados como controle endógeno para análise dos genes de interesse em cada cultura. Os genes que apresentaram o fold change mais próximo a 1 na condição 3D foram o PGK1 e o GUSB. Portanto para o estudo de diferentes condições de cultivo de CTMs proposto neste trabalho o escolhido foi o PGK1, pois teve a menor variação entre as duas condições, visto que nenhum dos genes apresentaram diferença significativa na expressão entre as condições de cultivo (Figura 7).



**Figura 7. Análise da expressão de genes de referência.** Os pontos com as barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). B2M,  $p = 0,4$ ; ACTB,  $p = 0,1$ ; PGK1,  $p = 0,5$ ; GAPDH,  $p = 0,1$ ; GUSB,  $p = 0,3$ ; PPIA,  $p = 0,2$ ; teste  $t$ .

#### 4.2.2. Análise da Expressão dos Genes de Interesse

Foram analisadas as alterações da expressão de genes das MMPs citadas anteriormente no item 3.6.2. Através do gráfico expresso na figura 8, levando-se em consideração a margem de erro, pode-se observar somente a expressão de 8 genes de metaloproteinases, sendo que as MMPs 8 e 9 não apresentaram níveis de expressão em algumas das culturas. Com isso, o resultado foi considerado inconclusivo para estes genes e por este motivo eles não foram levados em consideração nas análises. Para os diferentes cultivos realizados neste trabalho, observamos que as MMPs 2, 3, 13, 14, 15, 19 e 24 que foram expressas em todas as culturas nos dois grupos experimentais, não expressaram alteração significativa (Figura 8), já que pode-se notar que o valor de fold change destas girou em torno de 1, o valor de referência. Destes genes expressos, o que obteve-se alteração significativa foi o da MMP7 observando uma redução da sua expressão no grupo 3D (Figura 8).



**Figura 8. Análise comparativa da expressão de MMPs nas condições 2D e 3D.** (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; one-sample  $t$  test). Os pontos com as barras de erro representam a média  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ). MMP2,  $p = 0,4$ ; MMP3,  $p = 0,4$ ; MMP13,  $p = 0,4$ ; MMP14,  $p = 0,6$ ; MMP15,  $p = 0,8$ ; MMP19,  $p = 1,0$ ; MMP24,  $p = 0,6$ ; one-sample  $t$  test.

A Tabela 4 mostra um resumo de todos os resultados da análise de expressão gênica de MMPs realizada em nosso estudo.

**TABELA 4 – Panorama Experimental da Expressão Gênica de MMPs em CTMs Submetidas ao Cultivo 2D e 3D.**

<b>Gene (sigla)</b>	<b>Número de culturas em que ocorreu expressão (n=5)</b>	<b>Comparação da expressão*</b>
<b>MMP-2</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-3</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-7</b>	5	-
<b>MMP-8</b>	2	Inconclusivo
<b>MMP-9</b>	3	Inconclusivo
<b>MMP-13</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-14</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-15</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-19</b>	5	Sem alteração
<b>MMP-24</b>	5	Sem alteração

\*: resultado da condição 3D em relação à condição 2D.

-: redução.

Inconclusivo: inconsistência no aparecimento de amplificação, por razões desconhecidas, o que impede de se chegar a uma conclusão confiável.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Considerações Iniciais:

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm uma capacidade de proliferação rápida, alcançando uma expansão mil vezes maior do número de células em um período de duas a três semanas. Essas células podem ser diferenciadas *in vitro* e *in vivo* em vários tipos de células de origem mesenquimal, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Relatos demonstram que as CTMs secretam uma variedade de fatores que promovem a reparação tecidual, estimulam a proliferação e a diferenciação de progenitores endógenos do tecido e diminuem as reações inflamatórias e imunológicas. Como as CTMs não evocam uma resposta imune, elas são úteis para o reparo de órgãos e tecidos halogênicos. Pesquisas vêm demonstrando extensivamente o potencial de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea para terapias regenerativas em vários órgãos (LI e IKEHARA, 2014).

O ambiente de cultivo de CTMs 3D apresenta algumas vantagens em relação ao 2D. Este cultivo 3D pode ser realizado em matriz de colágeno, visto que o colágeno é encontrado em abundância nos tecidos, e é também facilmente extraído, além de representar o ambiente celular *in vivo*. O cultivo das CTMs na estrutura de colágeno levou ao aumento da expressão de vários genes relacionados ao reparo tecidual cerebral, segundo Changsheng e seus colaboradores (2011). Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que, no ambiente 3D as CTMs cultivadas aumentam sua efetividade terapêutica, uma vez que estas células foram capazes de promover a recuperação sensori-motora de ratos no modelo de lesão testado, após a lesão apenas quando estas foram entregues dentro de uma matriz de colágeno (DE FREITAS *et al.*, 2015).

As MMPs são enzimas dependentes de zinco que ajudam a regular a renovação dos componentes da matriz extracelular. Considera-se que desempenham um papel importante no desenvolvimento do embrião, na morfogênese e no remodelamento tecidual, bem como na invasão e metástase tumoral. Todas as MMPs são sintetizadas e a maioria é secretada como pró-

enzimas latentes que são ativadas por uma variedade de proteases. Em condições de estado estacionário, a atividade de MMP nos tecidos é quase indetectável.

No sistema nervoso central de mamíferos diferentes tipos de MMPs que podem ser detectados nos níveis de mRNA e proteína. Muitos trabalhos demonstram que as MMPs participam do desenvolvimento neuronal e têm capacidade de alterar a resposta a lesões e doenças neurológicas. Estudos com desenvolvimento neuronal revelam em suas análises uma regulação do desenvolvimento de várias de várias MMPs incluindo MMP 2, 9, 11, 12, 13, 14, 15 e 24, enquanto algumas MMPs, como, MMP3, MMP7 e MMP10 não respondem aos sinais e permanecem inalteradas durante o desenvolvimento neuronal (SINGH *et al.*, 2015).

## 5.2. Expressão dos Genes de Referência

Para uma exatidão nos dados de qPCR é necessária uma padronização para validar a expressão de genes de referência (housekeeping gene - HKGs) em cada tecido e em cada condição experimental. Estes genes codificam proteínas que são essenciais para a sobrevivência celular, por isso, a expressão desses genes deve ser estável em todas as células e tecidos em vários estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas e ambientais (NELISSEN *et al.*, 2010). Porém, estudos anteriores demonstraram que a expressão de HKG varia sob diferentes condições experimentais (JACOB *et al.*, 2013).

Ferraz e Fernandez, 2016, verificaram em seus experimentos que ACTB e B2M são os genes de referência menos estáveis em macrófagos, apresentando valores de  $\Delta\Delta C_T$  discordantes, um alto coeficiente de variância e alta estabilidade. Indicando que estes HKGs não são bons genes de referência neste tipo celular. Mostrou ainda que GAPDH, PGK1, PPIA, e RPL13A foram estáveis em uma ampla gama de expressão que foi estatisticamente significativa em todas as condições experimentais. A confiabilidade e estabilidade de PPIA foi verificada em macrófagos em todas as condições de cultura.

Um estudo investigando o gene mais estável a ser utilizado por qPCR em CTMs humanas, verificou através de três diferentes softwares que GAPDH e ACTB não eram confiáveis para a normalização de dados e identificou, PPIA e B2M como genes adequados, observaram ainda que o PGK1 obteve a mesma condição de variação nos 3 softwares.

Nossos resultados não mostraram diferença significativa entre as condições experimentais para os genes de referência analisados e, até onde se sabe, não existem estudos comparando diferentes genes de referência em CTMs murinas, portanto, para o melhor aproveitamento do nosso estudo, foi selecionado o PGK1 como HKG levando-se em consideração os resultados obtidos nos trabalhos citados anteriormente e seguindo o critério onde foi selecionado o gene de controle endógeno com *fold change* mais próximo a 1 na condição 3D.

### **5.3. Expressão das Metaloproteinases**

Em condições fisiológicas normais, as atividades das MMPs são reguladas, através da transcrição, ativação dos zimogênios precursores, interação com componentes específicos da MEC e inibição endógena (GAFFNEY *et al.*, 2015; STERNLICHT; WERB, 2009; NAGASE; WOESSNER JR., 1999). Essa inibição é realizada por inibidores específicos chamados TIMPs (Inibidores de Tecido de Metaloproteinases) (BREW, 2000). Uma série de citocinas e fatores de crescimento podem induzir ou inibir a produção das MMPs, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1), o fator beta transformador do crescimento (TGF- $\beta$ ), entre outros ( WERB, 2009; BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002; SIVAK; FINI, 2002; STERNLICHT). Quando ocorre uma perda do controle da atividade, doenças como artrite, câncer, aterosclerose, aneurismas, nefrite e fibrose podem ser desenvolvidas. Sob condições patológicas associadas a atividades de MMP desequilibradas, as mudanças dos níveis de TIMPs são consideradas importantes porque afetam diretamente o nível de atividade das MMPs (BRUYN *et al.*, 2016; SOLOMONOV *et al.*, 2016; NAGASE; WOESSNER JR., 1999).

As proteínas da família MMP7 estão envolvidas na quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como o desenvolvimento embrionário, a reprodução e o remodelamento tecidual, bem como nos processos patológicos, como artrite e metástase (REN *et al.*, 2018; VENTO *et al.*, 2018). Esta protease secretada difere da maioria dos membros da família MMP, na medida em que não possui um domínio de hemopexina C-terminal conservado. A enzima está envolvida na cicatrização de feridas, e estudos em camundongos sugerem que ela regula a atividade de defensinas na mucosa intestinal. Este gene exibe níveis elevados de expressão em múltiplos cânceres humanos (PARKS e MECHAM, 1998). Está envolvida na indução de diferenciação das CTMs em condrócitos (DJOUAD *et al.*, 2007), e vem sendo utilizada em estudos para a concepção de biomateriais que promovem a diferenciação das CTMs em cartilagem para fins de engenharia tecidual (BAHNEY *et al.*, 2011).

Desta forma, a redução da expressão da MMP-7 observada na condição 3D neste trabalho pode sugerir que este protocolo de cultivo não seja indutor de diferenciação das CTMs em condrócitos. Esses dados sugerem que o protocolo de cultivo utilizado induz condições onde as CTMs apenas se proliferem e cresçam em condições ideais, mimetizando o ambiente originário das células e não induz a sua diferenciação em outros tipos celulares. Embora os dados da literatura sugiram os benefícios de muitas das metaloproteinases na gênese e remodelamento de células e tecidos, nossos resultados em contrapartida demonstraram que a expressão dos genes de metaloproteinases, com exceção da MMP7, não alteraram significativamente as condições das células em comparação entre os modelos de cultivo analisados.

## **6. CONCLUSÕES**

Pelos resultados obtidos neste trabalho concluímos que o cultivo das CTMs em matriz de colágeno não afeta consideravelmente a expressão das MMPs investigadas em nenhuma das condições de cultivo avaliadas. No entanto, dos genes de metaloproteinases de matriz analisados a única MMP que apresentou redução significativa na sua expressão na condição 3D, foi a MMP7. Podendo sugerir uma redução no potencial de invasividade destas células e na sua diferenciação em condrócitos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, J. A. *et al.* Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochem. J.** v. 309, p. 299–306, 1995.

AUGELLO, A.; KURTH, T. B.; DE BARI, C. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. **European Cells and Materials**, v. 20, p. 121–133, 2010.

BAHNEY, C. *et al.* Visible Light Photoinitiation of Mesenchymal Stem Cell-Laden Bioresponsive Hydrogels. **Eur Cell Mater**, v. 22, p. 43-45, 2016.

BANFI, A. *et al.* Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. **Tissue Eng**, v. 8, n. 6, p. 901–910, 2002.

BARA, J. J. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. **Stem cells**, v. 32, n. 7, p. 1713–23, 2014.

BIANCO P.; ROBEY P.G.; SIMMONS P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313–319, 2009.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN D.; NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta**, 1477(1-2):267-83, 2000.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 207–214, 2002.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 278–294, 1997.

BRUYN, M. DE *et al.* The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.51, n. 5, p. 295–358, 2016.

CHAMBERLAIN, G. *et al.* Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHEN, Q. *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1128–1139, 2016.

CHOUDHERY, M. S. *et al.* Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 8, 2014.

CLARK, I. M. Matrix Metalloproteinase Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 3, 2001.

CLARKE, D. L. *et al.* Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1660–1663, 2000.

CLAROS, S. *et al.* Characterization of Adult Stem / Progenitor Cell Populations From Bone Marrow in a Three-Dimensional Collagen Gel Culture System. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 54, p. 2021–2032, 2012.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287–2299, 2008.

DE FREITAS, H. T. *et al.* Effect of the treatment of focal brain ablation in rat with bone marrow mesenchymal stromal cells on sensorimotor recovery and cytokine production. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 348, n. 1–2, p. 166–173, 2015.

DI MAGGIO, N. *et al.* Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 321–329, 2011.

DJOUAD, F. *et al.* Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2007.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.

EGUCHI, T. *et al.* Novel Transcription Factor-Like Function of Human Matrix Metalloproteinase 3 Regulating the CTGF/CCN2 Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 7, p. 2391–2413, 2008.

ETHELL, I. M.; ETHELL, D. W. In Vitro Characterization of a Human Neural Progenitor Cell Coexpressing. **Journal of Neuroscience Research**, v. 259, p. 250–259, 2007.

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. **J Exp Med**, v. 208, n. 3, p. 421–428, 2011.

ELASTOLYTIC, A. *et al.* Production and Localization of 92-Kilodalton Gelatinase in Abdominal Aortic Aneurysms. **J Clin Invest**, v. 96, p. 318–326, 1995.

FERRARI, G. *et al.* Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528–1530, 1998.

FERRAZ, F. B.; FERNANDEZ, J. H. Selection and validation of reference housekeeping genes in the J774A1 macrophage cell line for quantitative real-time PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.

FUJIOKA, H. *et al.* Neural Functions of Matrix Metalloproteinases: Plasticity, Neurogenesis, and Disease. **Biochemistry Research International**, p. 1–8, 2012.

GAFFNEY, J. *et al.* Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 191–199, 2015.

GAO, F. *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell death & disease**, v. 7, p. e2062, 2016.

HE, W. *et al.* CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2018.

HOOVER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **Febs Letters**, v. 354, p. 0–5, 1994.

HU, J. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 6, p. 480–498, 2007.

HUNTER, W. L.; ARSENAULT, A. L.; HODSMAN, A. B. Rearrangement of the metaphyseal vasculature of the rat growth plate in rickets and rachitic reversal: A model of vascular arrest and angiogenesis renewed. **The Anatomical Record**, v. 229, n. 4, p. 453–461, 1991.

ISERN, J.; MENDEZ-FERRER, S. Stem cell interactions in a bone marrow niche. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 210–218, 2011.

IWASE T. *et al.* Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. **Cardiovasc Res**, v. 66, p.543–551, 2005.

JACKSON, K. A. *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1395–1402, 2001.

JACOB, F. *et al.* Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

JOHANSSON, N.; AHONEN, M.; KÄHÄRI, V. M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 1, p. 5–15, 2000.

JOHNSON, L. J.; DYER, R.; HUPE, D. J. Matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 2, n. 37, p. 466–471, 1998.

KAWADA, H.; OGAWA, M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. **Blood**, v. 98, n. 7, p. 2008–2013, 2008.

KIM J.H. *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 50-6, 2002.

KOLB, C. *et al.* The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. **Immunology Letters**, v. 57, n. 1–3, p. 83–88, 1997.

KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 19, p. 10711–6, 1999.

KUMAR, S. *et al.* Triamcinolone acetonide decreases outflow facility in C57BL/6 mouse eyes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 1280–1287, 2013.

LAGASSE, E. *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1229–1234, 2000.

LI, C. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem cell research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 55, 2015.

LI, M.; GUO, K.; IKEHARA, S. Intractable diseases treated with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, p. 1–6, 2014.

LIECHTY, K. W. *et al.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1282–1286, 2000.

LIU, L.-L. *et al.* Morphological Observation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under Matrigel Three Dimensional Culture Conditions. **International Journal of Morphology**, v. 37, n. 1, p. 54–58, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LU D. *et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 92, p. 26–36, 2011.

LUNDBERG, L. G. *et al.* Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 1, p. 15–19, 2000.

MA, S. *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 2, p. 216–225, 2014.

MENDEZ-FERRER S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829–834, 2010.

MORSHEAD, C. M. *et al.* Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. **Nature medicine**, v. 8, n. 3, p. 268–273, 2002.

MULLER D. *et al.* The collagenase gene family in humans consists of at least four members. **Biochem J**, v. 253, n. 1, p.187-192, 1988.

NAGASE, H.; WOESSNER JR, J. F. Matrix Metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, No. 3, n. 30, p. 21491–21494, 1999.

NELISSEN, K. *et al.* Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 187, n. 1, p. 78–83, 2010.

OHUCHI, E. *et al.* Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. **J Biol Chem**. v. 272, n.4, p. 2446-51, 1997.

ORLIC, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701–705, 2001a.

ORLIC, D. *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10344–9, 2001b.

PENDAS, A. M. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Human Matrix Metalloproteinase with Unique Structural Characteristics, Chromosomal Location, and Tissue Distribution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4281–4286, 1997.

PÉREZ-SIMON, J. A. *et al.* Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: Results of a phase I/II clinical trial. **Haematologica**, v. 96, n. 7, p. 1072–1076, 2011.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 143, n. 1999, p. 143–148, 1999.

QU, C. *et al.* The treatment of TBI with human marrow stromal cells impregnated into collagen scaffold: Functional outcome and gene expression profile. **Brain Research**, v. 1371, p. 129–139, 2011.

REICHLIN, S. Handbook of Experimental Pharmacology. **The American Journal of The Medical Sciences**, v. 258p. 366, 1969.

REMPE, R. G. *et al.* Matrix Metalloproteinase-Mediated Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 18, p. 4301–4315, 2018.

REN, Z. *et al.* Placental growth factor reverses decreased vascular and uteroplacental MMP-2 and MMP-9 and increased MMP-1 and MMP-7 and collagen types I and IV in hypertensive pregnancy. **American Journal of Physiology-Heart**

**and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 1, p. H33–H47, 2018.

ROSE, R. A. *et al.* Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Express Cardiac- Functional Cardiomyocytes In Vitro. **Stem Cells**, v. 26, n. 11, p. 2884–2892, 2008.

RYAN, J. M. *et al.* Interferon- $\gamma$  does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 2, p. 353–363, 2007.

SANCHEZ-RAMOS, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Experimental neurology**, v. 164, n. 2, p. 247–256, 2000.

SANDERS, R. C. *et al.* Stem cell research. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–140, 2006.

SANTOS, B. P. *et al.* Associação de células-tronco mesenquimais com scaffold de colágeno para indução condrogênica. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde**, v. 1, p. 13–20, 2015.

SART, S. *et al.* Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. **Tissue Engineering Part B Rev**, v. 20, n. 5, p. 365–380, 2014.

SATO, H. *et al.* Assignment of the Human Genes for Membrane-Type-1 , -2 , and -3 Matrix by in Situ Hybridization. **Genomics Academic Press**, v. 413, p. 412–413, 1997.

SCHÄCHINGER, V. *et al.* Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial. **Nature clinical practice. Cardiovascular medicine**, v. 3 Suppl 1, n. March, p. S23-8, 2006.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n. 1–2, p. 69–81, 2000.

SCHWARZ, E. J. *et al.* Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. **Hum Gene Ther**, v. 10, n. 15, p. 2539–2549, 1999.

SEKINE-AIZAWA, Y. *et al.* Matrix metalloproteinase ( MMP ) system in brain : identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. **Eur J Neurosci**. v. 13, n. 5, p. 935-948, 2001.

SHIPLEY, J. M. *et al.* Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 3942–3946, 1996.

SINGH, D. *et al.* Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, n. May, p. 1–5, 2015.

SIVAK, J. M.; FINI, M. E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, p. 1–14, 2002.

SOLOMONOV, I. *et al.* Distinct biological events generated by ECM proteolysis by two homologous collagenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 39, p. 10884–10889, 2016.

SPINALE, F. G. Matrix Metalloproteinases: Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. **Circ Res**, p. 520–530, 2002.

SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. **Cell transplantation**, v. 25, n. 5, p. 829–48, 2016.

STEFFENS, D.; PRANKE, P. Substituto tissular, composição, processo de obtenção, uso de substituto tissular e processo de regeneração tecidual. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, **República Federativa do Brasil**, Instituto Nacional da Propriedade Industrial, n. 21, 2017.

STERNLICHT, M.; WERB, Z. How Matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, p. 463–516, 2009.

SUZUKI, K. *et al.* Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). **Biochemistry**, v. 29, n. 44, p. 10261–70, 1990.

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine veterinary journal**, v. 39, n. 2, p. 172–180, 2007.

THOMSON J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 2, p. 1–18, 2015.

ULRICH, R. *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: A reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study. **Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 408–418, 2005.

URIA, J. A.; LOPEZ-OTIN, C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. **Cancer Research**, v. 60, n. 17, p. 4745–4751, 2000.

VELASCO, G. *et al.* Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4570–4576, 1999.

VENTO S. I. *et al.* MMP-7 expression may influence the rate of distant recurrences and disease-specific survival in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Archiv Springer**, v. 472, n. 6, p. 975–981, 2018.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

WAGNER, W. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

WOESSNER JR, J. F.; TAPLIN C. J. Purification and Properties of a Small Latent Matrix of the Rat Uterus. **The Journal of Biological Chem**, p. 11–21, 1988.

YE, S. *et al.* Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 13055–13060, 1996.

YOKOYAMA, Y. *et al.* Matrilysin (MMP-7) Is a Novel Broadly Expressed Tumor Antigen Recognized by Antigen-Specific T Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 17, p. 5503–5511, 2008.

YONG, V. W. Metalloproteinases: Mediators of pathology and regeneration in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 931–944, 2005.