

ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES DE
INTEGRINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS
EM MATRIZ DE COLÁGENO E NO MODELO DE CULTIVO
CONVENCIONAL

GISELA GARCIA CABRAL GALAXE DE ALMEIDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL 2017

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES DE
INTEGRINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS
EM MATRIZ DE COLÁGENO E NO MODELO DE CULTIVO
CONVENCIONAL**

GISELA GARCIA CABRAL GALAXE DE ALMEIDA

“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. Dr. Arthur Giraldi Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL 2017

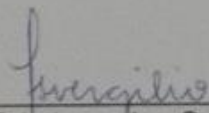
ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES DE INTEGRINA
EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM MATRIZ DE
COLÁGENO E NO MODELO DE CULTIVO CONVENCIONAL

GISELA GARCIA CABRAL GALAXE DE ALMEIDA

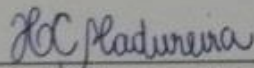
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia

APROVADA: 17/04/2017

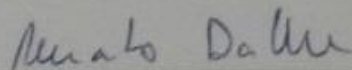
BANCA EXAMINADORA



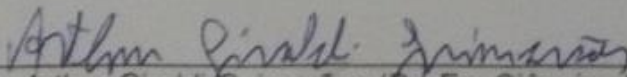
Prof.^a Dr.^a Cristiane dos Santos Vergilio (Dr.^a Em Biociências e Biotecnologia) - UFES



Prof.^a Dr.^a Hérica Chagas Madureira (Dr.^a em Genética e Melhoramento de Plantas) - IFES



Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciências) – UENF/CBB/LBCT



Prof. Dr. Arthur Giraldo Guimarães (Dr. Em Ciências Biológica – Biofísica) – UENF/CBB/LBCT (Orientador)

Resumo

As células-tronco mesenquimais (MSCs) de medula óssea são células-tronco adultas caracterizadas como células clonais, multipotentes, com morfologia de fibroblastos e aderentes ao plástico. O modelo de cultivo convencional é em ambiente bidimensional (2D), as células estão aderidas sobre uma superfície de plástico, sendo este modelo muito diferente do ambiente natural da célula, formado por uma rede de proteínas que compõem a matriz extracelular, responsável pela sustentação mecânica e ajuda na organização tecidual e na comunicação celular. O modelo de cultivo em ambiente tridimensional (3D) é uma abordagem mais próxima do observado *in vivo* oferecendo interações químicas e mecânicas que influenciam o comportamento geral da célula (adesão, migração, proliferação, diferenciação e liberação de fatores). As integrinas são proteínas transmembrana que estão envolvidas com a adesão, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. O objetivo do presente estudo foi comparar a expressão das subunidades de integrina entre MSCs cultivadas apenas em ambiente 2D e MSCs cultivadas em matriz de colágeno (3D). Para o cultivo 2D as MSCs foram extraídas da medula óssea de ratos da linhagem Wistar e plaqueadas em placas de 24 poços aderida ao poço. Enquanto que para o cultivo 3D, foram cultivadas em uma matriz de colágeno. Após 24 horas, o RNA total das MSCs em cada condição foi extraído. Os genes das diferentes subunidades de integrina foram amplificados por PCR em tempo real a partir do cDNA sintetizado, utilizando primers específicos. As subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, αL , αM , αX , αD , $\beta 4$, $\beta 6$, $\beta 7$ e $\beta 8$ não apareceram em nenhuma das condições estudadas ou não apareceram em todas as culturas. As subunidades $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 11$, αV , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 5$ em todas as três culturas. As subunidades $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 5$ foram as únicas subunidades que apresentaram diferença de expressão significativa entre a condição sem colágeno (2D) e com colágeno (3D). Nesse trabalho foi possível concluir que existem diferenças na expressão de subunidades de integrina entre MSCs cultivadas em matriz de colágeno e no cultivo convencional. Esses resultados já foram observados por outros autores utilizando MSCs de diferentes origens. É possível que essas subunidades de integrina modifiquem o fenótipo da célula por participarem de processos como adesão, proliferação, diferenciação e migração celular.

Palavras chave: Matriz de colágeno. PCR quantitativo. Integrina. Células-tronco mesenquimais. Cultivo tridimensional.

Abstract

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells characterized as clonal cells, multipotent, with fibroblast morphology and adherent to the plastic. The conventional culture model is in two-dimensional (2D) environment, the cells are adhered on a plastic surface, this model being very different from the natural environment of the cell, formed by a network of proteins that make up the extracellular matrix, responsible for the mechanical sustentation And helps in tissue organization and cell communication. The three-dimensional (3D) culture model is a closer approach to that observed in vivo by providing chemical and mechanical interactions that influence the overall behavior of the cell (adhesion, migration, proliferation, differentiation and release of factors). Integrins are transmembrane proteins that are involved in cell adhesion, migration, proliferation, differentiation, and survival. The objective of the present study was to compare the expression of integrin subunits between MSCs cultured only in 2D environment and MSCs grown in collagen matrix (3D). For 2D culture the MSCs were extracted from the bone marrow of Wistar rats and plated on 24 well plates adhered to the well. While for 3D cultivation, they were grown in a matrix of collagen. After 24 hours, the total RNA of the MSCs in each condition was extracted. The genes of the different integrin subunits were amplified by real-time PCR from the synthesized cDNA, using specific primers. The subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, αL , αM , αX , αD , $\beta 4$, $\beta 6$, $\beta 7$ and $\beta 8$ did not appear in any of the conditions studied or did not appear in all cultures. The subunits $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 11$, αV , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ and $\beta 5$ in all three cultures. The subunits $\alpha 3$, $\beta 1$ and $\beta 5$ were the only subunits that showed significant expression difference between the condition without collagen (2D) and with collagen (3D). In this work it was possible to conclude that there are differences in the expression of integrin subunits between MSCs cultured in collagen matrix and in conventional culture. This results have already been observed by other authors using MSCs of different origins. It is possible that these integrin subunits modify the cell phenotype by participating in processes such as adhesion, proliferation, differentiation and cell migration.

Key-words: Collagen matrix. quantitative PCR. Integrin. Three-dimensional culture. Mesenchymal stem cells.

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação das células-tronco	2
Figura 2. Potencial de diferenciação e autorrenovação das células-tronco mesenquimais.....	3
Figura 3. Potencial imunoregulatório das células-tronco mesenquimais	6
Figura 4. Ação das células-tronco mesenquimais sobre as células do sistema nervoso	8
Figura 5. Estrutura da proteína integrina na membrana plasmática.....	11
Figura 6. Subunidades de integrinas.....	12
Figura 7. Ativação e sinalização das integrinas.....	13
Figura 8. Análise da expressão de CD29 e CD90 na superfície de células-tronco mesenquimais de medula óssea por citometria de fluxo.....	21
Figura 9. Análise da expressão de CD11b e CD45 na superfície de células-tronco mesenquimais de medula óssea por citometria de fluxo.....	22
Figura 10. Análise da expressão do marcador CD45 em células mononucleares de medula óssea de rato por citometria de fluxo.....	22
Figura 11. Análise da expressão do marcador CD11b em macrófagos peritoneais de camundongos por citometria de fluxo.....	23
Figura 12. Análise da expressão do gene de referência.....	23
Figura 13. Análise das subunidades de integrina.....	24

Lista de Quadros

Quadro 1. Ciclagem para a síntese do cDNA.....	18
Quadro 2. Ciclagem utilizada em todos os experimentos de qPCR.....	19
Quadro 3. Subunidades de integrinas que foram analisadas por qPCR.....	20
Quadro 4. Listagem de genes testados para controle endógeno	20
Quadro 5. Resultado das análises de PCR quantitativo.....	25

Lista de Abreviaturas

- ❖ 2D - Bidimensional
- ❖ 3D – Tridimensional
- ❖ CCL2 - Chemokine (C-C motif) ligand 2
- ❖ cDNA – DNA complementar
- ❖ CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais
- ❖ CFU-Fs - Unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (do inglês: *colony-forming unit fibroblasts*)
- ❖ Ct - Cycle Threshold
- ❖ DC – Células dendríticas
- ❖ DMEM/F12 – Meio de cultura celular Dulbecco e mistura de nutrientes Ham F12 (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- ❖ EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ❖ HGF – Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: *Hepatocyte growth fator*)
- ❖ IFN – Interferon
- ❖ IgG – Imunoglobulina G
- ❖ IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 - Interleucinas 1, 2, 4, 6, 10, 12, 15.
- ❖ MEC – Matriz Extracelular
- ❖ MSCs – Células-tronco mesenquimais (do inglês: *mesenchymal stem cell*)
- ❖ M-CSF – Fator de estimulação de colônias de macrófagos (do inglês: *macrophage colony-stimulating factor*)
- ❖ NK - *natural killer*
- ❖ PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês: *phosphate buffered saline*)
- ❖ PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)
- ❖ PGE2 – prostaglandina E2

- ❖ RNA - Ácido ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic acid*)
- ❖ RQ – Quantificação Relativa (do inglês: *relative quantification*)
- ❖ TGF- β – Fator de crescimento transformante beta (do inglês: *transforming growth beta*)
- ❖ TNF - Fator de Necrose Tumoral (do inglês: *tumor necrosis factor*)
- ❖ VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: *vascular endothelial growth fator*)

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Células-tronco	1
1.2. Células-tronco mesenquimais (MSCs)	2
1.3. Propriedades imunomodulatórias das MSC e reparo tecidual	4
1.4. O uso de MSCs em terapia celular no sistema nervoso central.....	7
1.6. Integrinas	11
2. Objetivo.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1. Modelo Animal	16
3.2. Obtenção e Cultivo das MSCs	16
3.3. Análise Fenotípica das MSCs	17
3.5. Extração do RNA total e Síntese do cDNA	18
3.6. Análise da Expressão de Genes Via PCR Quantitativo	19
3.7. Escolha do gene controle.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Caracterização das MSCs por citometria de fluxo	21
4.2. Análise da expressão do gene de referência	23
4.3. Análise da expressão das subunidades de integrina no cultivo 2D e 3D	24
5. Discussão.....	26
6. Conclusão.....	29
7. Bibliografia.....	30

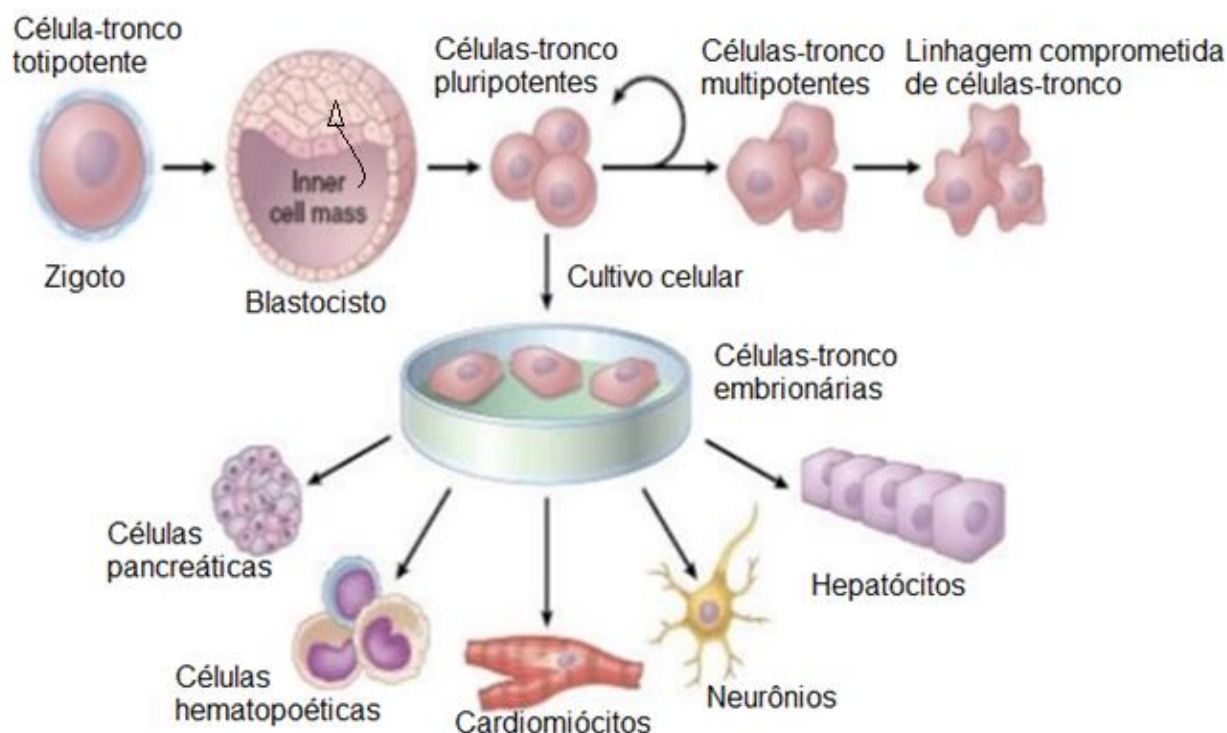
1. Introdução

1.1. Células-tronco

As células-tronco são caracterizadas por suas habilidades de auto-renovação e diferenciação em mais de um tipo celular (Fuchs, et al., 2004). Elas podem ser divididas em embrionárias, fetais ou adultas de acordo com a sua origem e em totipotentes, pluripotentes e multipotentes de acordo com a sua plasticidade (Latsinik, et al., 1981; Thomson, et al., 1998).

As células-tronco totipotentes são as células do embrião até a conformação de 8 células e o zigoto. Essas células podem se diferenciar em células dos três folhetos embrionários e em tecidos extraembrionários. As células-tronco pluripotentes podem ser isoladas da massa celular interna do blastocisto (embrioblasto) um estágio antes da implantação na parede uterina. Essas células podem se diferenciar em células dos três folhetos embrionários porém não se diferenciam em células de tecidos extraembrionários (Chen et al., 2016) (Fig. 1). Podem ser expandidas em cultura e, também é conhecido que quando injetadas em camundongos imunossuprimidos podem dar origem a teratomas (Thomson et al., 1998). As células-tronco multipotentes podem ser encontradas em vários tecidos fetais e adultos e têm a capacidade de se diferenciar apenas em células do folheto embrionário a qual pertencem. Quando estimuladas por determinados fatores *in vitro* elas podem se diferenciar em células de tecidos derivados de outros folhetos embrionários (Schwindt et al., 2005; Bernemann et al., 2011). Um exemplo de célula multipotente são as células tronco mesenquimais de medula óssea que foram usadas neste trabalho.

As células-tronco também podem ser produzidas em laboratório a partir de uma célula somática qualquer. Essas células são chamadas de células tronco pluripotentes induzidas (iPS). Uma forma de produzir uma iPS é adicionando fatores de reprogramação como Oct4 (Octamer binding transcription factor-4), Sox2 (Sex determining region Y)-box 2 e Klf4 (Kruppel Like Factor-4) (Takahashi et al., 2006). Foi demonstrado que essas células podem se auto renovar e dar origem a células dos três folhetos embrionários assim como as células-tronco pluripotentes que ocorrem naturalmente (Takahashi et al., 2006; Chen et al., 2016).

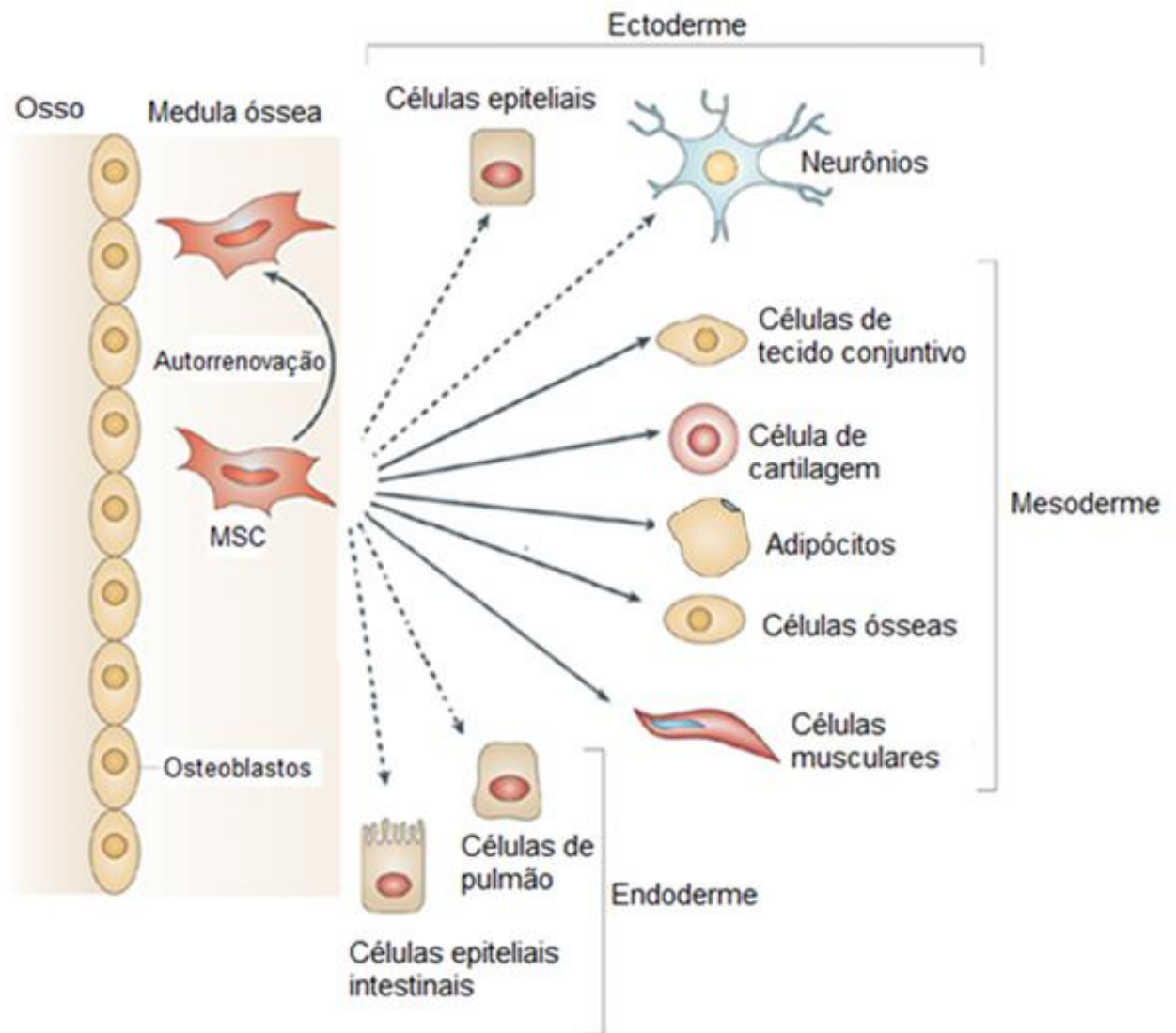


Copyright 2010 by Saunders, an imprint of Elsevier inc.

Figura 1. Classificação das células-tronco. As células tronco podem ser divididas em totipotente, pluripotente ou multipotente de acordo com o seu potencial de diferenciação.

1.2. Células-tronco mesenquimais (MSCs)

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco adultas que podem, por exemplo, ser isoladas da medula óssea, tecido adiposo, fluido amniótico e cordão umbilical. São células multipotentes, podendo se diferenciar em células de tecidos originados da mesoderme como osteócitos, adipócitos e condrócitos (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999). Elas também podem se diferenciar em células de tecido de outros folhetos embrionários quando estimuladas *in vitro* (Fig. 2) (Pittenger et al., 1999; Uccelli, et al., 2008; Schipani et al., 2009).



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Potencial de diferenciação e autorrenovação das células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em células de tecidos da mesoderme, porém podem ser induzidas a se diferenciar em células de tecidos originados de outros folhetos embrionários por um processo chamado transdiferenciação. Adaptado de Uccelli, et al., 2008.

As células-tronco mesenquimais foram isoladas pela primeira vez na década de 1970 a partir de células da medula óssea. Elas foram caracterizadas como células clonais com morfologia de fibroblastos e aderentes ao plástico e inicialmente chamadas de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-FS) (Friedenstein et al., 1974). Essas células são cultivadas em placas de plástico, tornando possível o isolamento das células aderentes. Até o momento não foi

identificado um marcador específico para células-tronco mesenquimais e por isso elas são caracterizadas pela presença e ausência de determinadas proteínas. Algumas das proteínas presentes em MSCs são CD73, CD29, CD90, CD105, CD49b, CD49e, CD54, CD166, CD50, CD62L e CD106 e as ausentes são CD14, CD11b, CD45, CD34, CD79, CD19, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD40L. (Dean, et al., 2000; Tse, et al., 2003).

Como resultado da sua capacidade de diferenciação e auto renovação, essas células foram consideradas células-tronco e nomeadas como células-tronco mesenquimais (MSCs) (Caplan, 1991). Por representarem uma fração de apenas 0,001-0,01% da população total de células nucleadas da medula óssea (Pittenger et al., 1999), é necessária à sua expansão *in vitro*. Essas células são facilmente expandidas em cultura, podem se diferenciar em vários tipos celulares e, por isso, há um grande interesse no uso dessas células em terapia celular.

1.3. Propriedades imunomodulatórias das MSC e reparo tecidual

As células-tronco mesenquimais são capazes de reparar tecidos formados a partir da mesoderme como cartilagem, músculo, tendões, ligamentos e ossos, mas também pode agir reparando tecido nervoso, epitelial e fígado (Jackson et al., 2012). Além de reduzirem a inflamação local e promoverem a formação de uma matriz extracelular, as MSCs estão envolvidas no processo de angiogênese, produzindo o fator de crescimento endotelial (VEGF), e também podem agir reduzindo apoptose (Zhang et al., 2013; Schweizer et al, 2014). MSCs de medula óssea e derivadas de tecido epitelial combinadas com uma matriz a base de colágeno (Integra e Pelnac) também tem sido usadas para o tratamento de feridas (Leonardi et al., 2012; da Silva et al., 2014).

As MSCs também possuem atividade antimicrobiana por meio da secreção de proteínas antimicrobianas e de fatores imuno-regulatórios (Isakson et al., 2015; Zahorec et al., 2015). Em função do seu potencial imuno-regulatório (Wan et al., 2008), multipotencialidade e fácil expansão em cultura, as MSCs vem sendo estudadas como agente terapêutico (Patel et al., 2008).

As MSCs podem regular células da imunidade inata e adaptativa através da supressão de linfócitos T e da maturação de células dendríticas, reduzindo a ativação e proliferação de linfócitos B, proliferação e citotoxicidade das células *natural killer* e

promovendo a diferenciação de células T regulatórias (Yagi et al., 2010; Fu et al., 2012; Sun et al., 2012). A supressão ou ativação dessas células do sistema imune pelas MSC ocorre por contato direto com a célula (Kim et al., 2013) ou por meio de interação parácrina, através da liberação de fatores solúveis que atuam sobre as células do sistema imunológico (Nauta et al., 2007; Su et al., 2014). Por meio do contato célula-célula as MSCs podem diminuir a proliferação de linfócitos T e estimular a proliferação e função de linfócitos T reguladores. As células T regulatórias são uma população de células T que inibe respostas imunes pró-inflamatórias (Krampera et al., 2003; Han et al., 2011). As MSCs liberam substâncias como indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e interleucina 10 (IL-10). O NO é um dos fatores liberados pelas MSCs que inibe a proliferação de linfócitos T CD4 e CD8+ (Krampera et al., 2006; DelaRosa et al., 2009).

As células *natural killer* (NK) são células com atividade citotóxica, produzem citocinas pró-inflamatórias e são importantes na resposta antiviral e antitumoral. Quando incubadas com MSCs, as células NK quase não proliferam e diminuem a produção de INF- γ . É possível que isso aconteça porque as MSCs produzem fatores como PGE2 e TGF- β que suprimem a produção IL-2, IL-15 e INF- γ (Spaggiari et al., 2008; Regulski et al., 2016) (Fig. 3). As MSCs também podem suprimir a proliferação, supressão e diferenciação de linfócitos B através da produção e liberação de fatores solúveis como IL-1, CCL2 e PGE2 (Nauta et al., 2007; Li et al., 2017).

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígeno. Elas induzem resposta em linfócitos T e produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Quando co-cultivadas com MSCs, as células dendríticas apresentam diminuição na expressão de MHC II, CD11c, CD83 e moléculas co-estimulatórias. As MSCs podem impedir a maturação das células dendríticas imaturas (iDCs) em células dendríticas maduras (mDCs) por meio da produção de HGF, TGF- β e PGE2 (Aggarwal et al., 2005; Nauta et al., 2007) (Fig. 3). As MSCs também inibem a liberação de IL-12 e TNF- α (Nauta et al., 2006; Ramasamy et al., 2007).

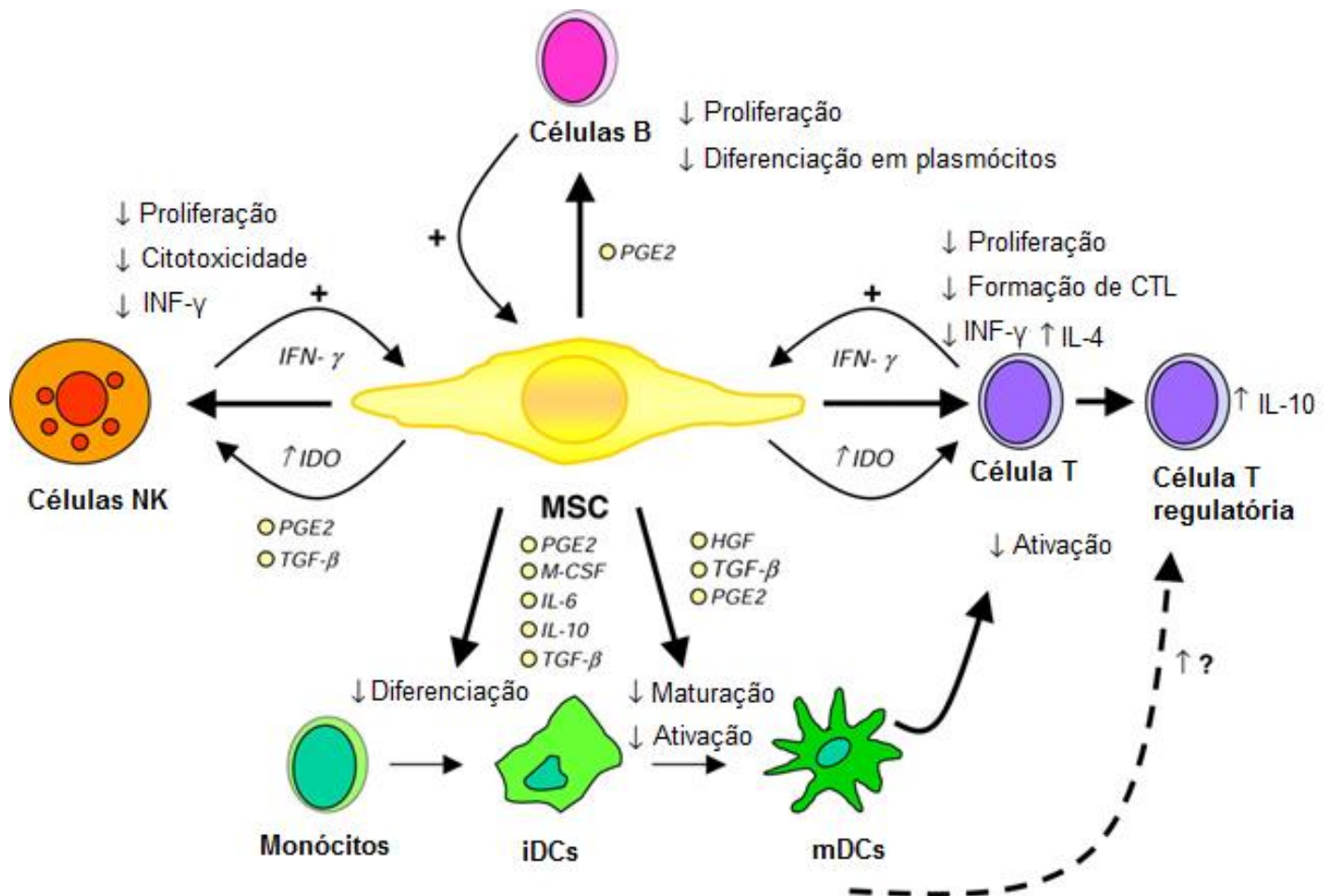


Figura 3: Potencial imunoregulatório das células-tronco mesenquimais. As MSCs podem inibir a proliferação e diminuir a citotoxicidade das células NK através da produção de PGE2 e TGF- β . É possível que as MSCs inibam IL-2 ou IL-15 inibindo a proliferação e produção de IFN- γ por essas células. As MSCs podem inibir a diferenciação e maturação de monócitos em células dendríticas (DC) que funcionam como células apresentadoras de antígeno para linfócitos T além a produzir fatores. O efeito inibitório das MSCs na diferenciação dessas células pode ocorrer por meio da liberação de fatores solúveis como IL-6, IL-10, M-CSF e PGE2. A maturação das células dendríticas imaturas (iDCs) em células dendríticas maduras (mDCs) pode ser impedida por meio da produção de HGF, TGF- β e PGE2 pelas MSCs. As MSCs induzem a produção de IL-10 pelas células dendríticas plasmocitoides (pDCs) promovendo a diferenciação e células T reguladoras. As células T reg. são uma população de células T que inibe a ativação do sistema imunológico. As MSCs promovem a diminuição na produção de IFN- γ e aumento na produção de IL-4, o que indica a mudança de um estado pró-inflamatório para um anti-inflamatório. As MSCs também podem inibir a proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTL). (Nauta et al., 2007)

As MSCs podem sair da corrente sanguínea de forma similar as células do sistema imunológico através da expressão de moléculas de adesão como selectinas e integrinas em sua superfície e, migrar para áreas lesadas (Ruster, et al., 2006). É estimado que cerca de 80% das MSCs injetadas via intravenosa após isquemia cerebral sejam encontradas no hemisfério lesado (Chopp et al., 2002; Barry et al., 2004).

1.4. O uso de MSCs em terapia celular no sistema nervoso central

As MSCs podem agir sobre as células do sistema nervoso diminuindo apoptose na região do infarto, aumentando a angiogênese, neurogênese, sinaptogênese, promovendo reorganização neural (Fig. 4) e recuperação funcional em modelo animal (Sandu, et al., 2017). Após isquemia cerebral as MSCs podem aumentar a expressão de fatores de crescimento, citocinas e fatores neurotróficos. Dentre esses fatores estão o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento derivado das células da glia (GDNF) e fator de crescimento endotelial (VEGF) (Castillo-Melendez et al., 2013).

As MCS também podem diminuir a infiltração de macrófagos e ativação da micróglia que são células que participam da defesa do sistema nervoso (Tsai et al., 2014). A não ativação dessas células após lesão cerebral pode ser positiva pois indica redução de inflamação. Já foi observado, em cultivo de MSCs com micróglia ativada por LPS que as MSC podem modificar o fenótipo dessas células. (Giunti et al., 2012). As MSC também podem inibir a redução da mielina dos axônios através da liberação de fatores (Lindsay et al., 2016).

Estudos do nosso grupo têm demonstrado o efeito terapêutico das MSCs de medula óssea em modelos de lesão cerebral (De Vasconcelos dos Santos et al., 2010; De Freitas et al., 2012; De Freitas et al., 2014). Em recente estudo, foi demonstrado o efeito terapêutico da administração das MSCs cultivadas em matriz de colágeno em modelo de ablação cerebral focal (De Freitas et al., 2014). Nesse estudo foram comparadas duas vias de administração das MSCs, a via intralesional e a intravenosa. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: intravenosa com MSCs (cultivo 2D), intravenosa com PBS, intralesional com matriz de colágeno, intralesional com matriz de colágeno com MSCs, intralesional com MSCs (cultivo 2D) e PBS intralesional. Foi observada uma maior recuperação neurológica de ratos tratados com

as MSCs no colágeno do que quando tratados apenas com as MSCs ou PBS via intralesional no teste de recuperação da pílula e alcance na câmara (RCPR), porém o grupo dos animais tratados com células (2D) por via intravenosa apresentaram maior recuperação no teste do cilindro. (De Freitas et al., 2014). Este trabalho motivou o aprofundamento da análise do efeito do cultivo em matriz de colágeno (3D) na expressão de genes de interesse terapêutico.

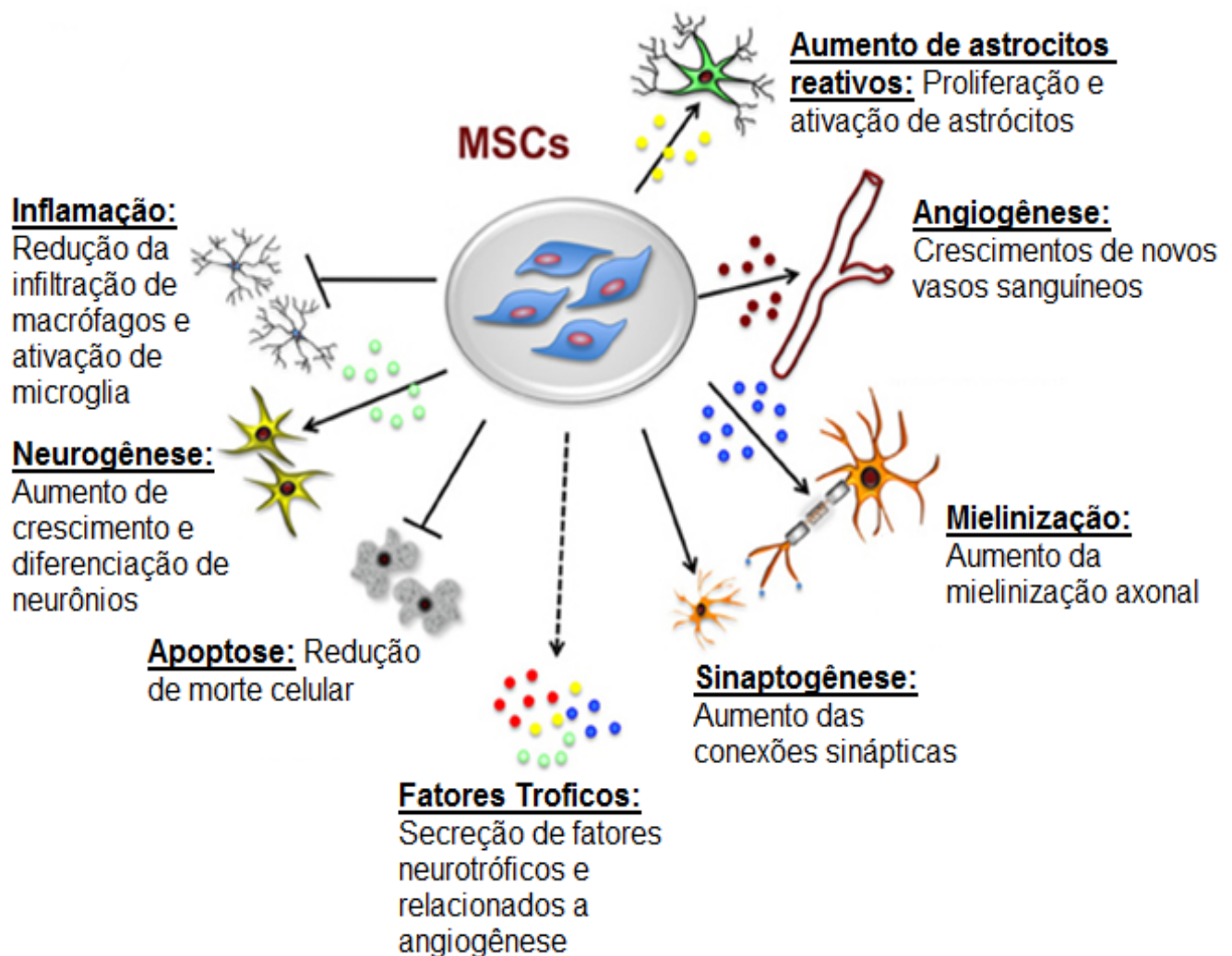


Figura 4: Ação das células-tronco mesenquimais sobre as células do sistema nervoso. As MSC podem reduzir inflamação, aumentar o número de sinapses e reduzir apoptose na região da lesão. Podem também contribuir para o processo de angiogênese e mielinização de axônios. Adaptado de Castillo-Melendez et al., 2013.

1.5. Cultivo Celular em Ambiente Bidimensional e Tridimensional

O modelo de cultivo bidimensional, onde as células são cultivadas em monocamadas e aderidas a substratos como plástico ou vidro é o modelo de cultivo convencional para células aderentes. O cultivo bidimensional foi e ainda é muito importante para estudos na biologia como por exemplo na descoberta de novos medicamentos e compreensão de mecanismos de ação de vírus, bactéria e protozoários. Além disso, é uma alternativa relativamente barata e reduz significativamente o número de animais de experimentação. No entanto, esse modelo não é muito eficiente em mimetizar o comportamento das células *in vivo* (Owen et al., 2010).

O cultivo em ambiente tridimensional é o modelo que mais se aproxima do observado *in vivo*, onde a célula se encontra envolvida por uma matriz extracelular (MEC) composta de proteínas que além do suporte químico já oferecido no cultivo bidimensional oferece também o suporte mecânico que também é encontrado no microambiente natural da célula que no caso das células-tronco mesenquimais de medula óssea é o nicho hematopoiético. Nesse modelo as interações célula-célula e célula-MEC se encontram maximizadas em relação ao observado no cultivo bidimensional (Suh et al., 2011; Haque et al., 2010). A dificuldade das células, no modelo bidimensional, de se conectarem umas com as outras e com uma matriz proteica pode limitar a morfologia, polaridade, proliferação, viabilidade, diferenciação, expressão de genes e proteínas nas células modificando resposta a estímulos em geral (Kong et al., 2013; Li et al., 2013).

Quando as células nos modelos bidimensional (2D) e o modelo tridimensional (3D) são comparadas a primeira diferença observada é na morfologia. As células do cultivo 2D se ligam apenas no lado em que está o substrato (ex: plástico, vidro) e essa ligação e espalhamento ocorrem em questão de minutos, enquanto que no ambiente 3D ocorrem em toda superfície da célula e levam de horas a dias para ocorrerem e envolvem reações proteolíticas (Baker et al., 2012; Khetan et al., 2010). Quando retiradas de seus tecidos de origem e plaqueadas, algumas células passam a proliferar de maneira anormal e perdem o seu fenótipo natural, porém quando transferidas para o cultivo 3D, alguns desses tipos celulares recuperam suas funções e morfologia (Kim et al., 2015).

A polaridade é também uma característica importante que o ambiente 3D tem se mostrado capaz de manter. No cultivo 2D, essa capacidade pode ser perdida. Quando células epiteliais são cultivadas em placas (2D) elas perdem a polaridade apical-basal, porém quando cultivadas no modelo 3D, elas são capazes de manter essa polaridade. Células de epitélio glandular, por exemplo, são capazes de formar um lumen onde secretam fatores quando cultivadas em 3D (Plachot et al., 2009; (Murray et al., 2014; Kim et al., 2015; Manninen, 2015).

O modelo de cultivo também influencia na viabilidade e proliferação das células. Hepatócitos, por exemplo, quando cultivados em monocamada perdem a capacidade de sintetizar enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas, entram em um processo de desdiferenciação e morrem enquanto que quando cultivados em matriz tridimensional suas características são mantidas. (Treyer et al., 2013; Murray et al., 2014).

Para a composição da matriz 3D, os biomateriais mais utilizados são o colágeno e ácido hialurônico pois apresentam biocompatibilidade, degradabilidade e habilidade de promover proliferação, migração e diferenciação celular (Hu et al., 2014b). Neste trabalho foi utilizada uma matriz composta de colágeno tipo I (3 mg/ml; Gibco, Invitrogen).

O colágeno é uma proteína estrutural formada por três cadeias polipeptídicas que são ligadas por ligações não covalentes, formando uma tripla hélice. A estrutura primária do colágeno tipo I é formada por Gly-X-Y. Os aminoácidos prolina e hidroxiprolina são os mais frequentes na posição X e Y. (Pawelec et al., 2016; Zhang and Stefanovic, 2016).

1.6. Integrinas

Integrinas são uma família de proteínas transmembrana que podem formar receptores heterodiméricos para várias proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina, trombospondina, tenascina e colágeno. Esses receptores são constituídos de uma subunidade α e uma subunidade β ligadas de forma não covalente, que tornam possível a interação célula-célula e célula-matriz (Hynes, 2002) (Fig. 5).

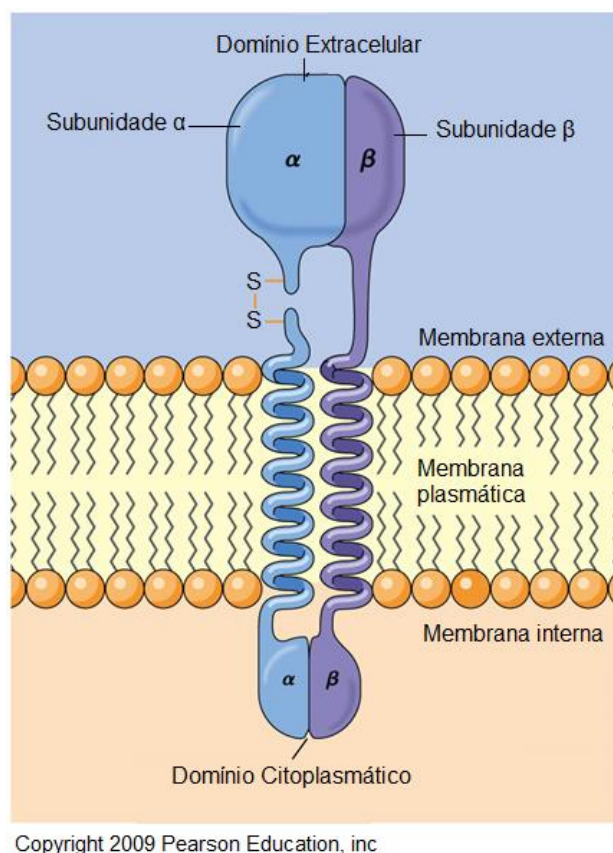
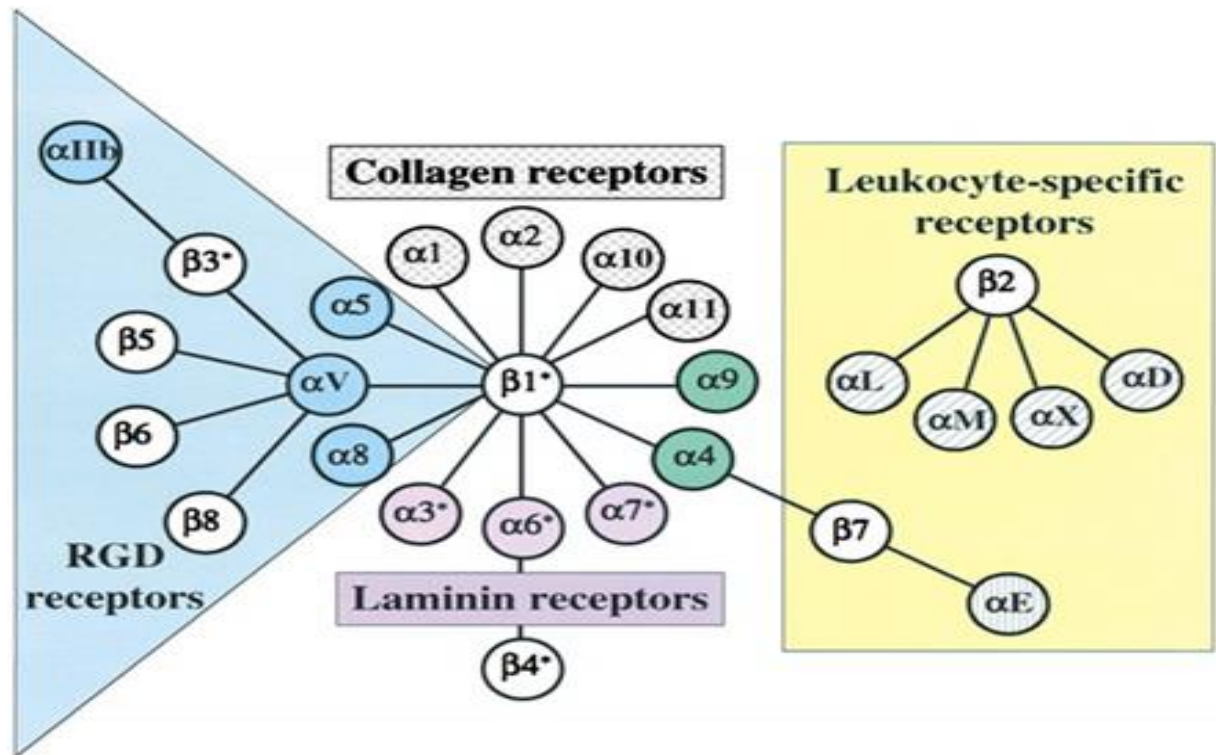


Figura 5. Estrutura da proteína integrina na membrana plasmática. A integrina é uma proteína transmembrana formada por duas subunidades (α e β).

Em vertebrados foram descritos 24 heterodímeros de integrinas formados pela combinação de 18 subunidades α e 8 de subunidades β (Hynes, 2002) (Fig. 6). Todas as subunidades α e β , com exceção de β_4 , possuem domínios extracelulares grandes, seguidos por uma única hélice transmembrana e um domínio citoplasmático curto (Hynes, 2002) (Fig. 5)

O contato célula-matriz e célula-célula são importantes para regular a atividade de todas as células do organismo, e já que as integrinas são uma família de proteínas que permitem essas interações, elas têm um papel muito importante para a maioria das células do corpo (Silva, et al., 2008).



Hynes, 2002 *Cell* 110:673-687

Figura 6. Subunidades de integrinas. As subunidades α e β de integrinas combinadas podem formar receptores que interagem com proteínas da MEC. As subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αL , αM , αX , αD e αE têm um domínio I ou A inserido e estão presentes apenas em vertebrados. As subunidades $\alpha 5$, $\alpha 8$, αV e $\alpha 11b$ formam os receptores RGD que se ligam a proteínas (fibronectina e vitronectina) da MEC na sequência RGD de aminoácidos. Esses receptores e os receptores de laminina estão amplamente distribuídos em metazoa. As subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 9$ estão presentes apenas em cordados. (Hynes, 2002).

Uma característica de muitas integrinas é a capacidade de se ligar a vários ligantes. Elas podem se ligar a proteínas da matriz subendotelial como fibronectina, vitronectina e colágeno ou a proteínas do plasma como fatores do sistema complemento e fibrinogênio. As integrinas podem se ligar a suas proteínas ligantes de várias formas. Algumas integrinas podem se ligar a determinadas proteínas na sequência de aminoácidos RGD. Essas integrinas se ligam a uma grande variedade

de ligantes extracelulares, são importantes para o desenvolvimento, angiogênese, fibrose e ativação de TGF- β (Barczyk et al., 2010; Hynes, 2007, 2009; Munger et al., 2011, Manninen et al., 2016). O um outro grupo é o das integrinas ligantes de *motifs* formados de aminoácidos ácidos. O terceiro grupo é o de integrinas com um domínio- A que contêm um domínio α I inserido na subunidade α que faz par com a subunidade β 1 formando uma subfamília específica de receptores de colágeno e laminina. O último grupo é composto pelas integrinas que formam receptores de laminina porém não possuem o domínio α I nas subunidades α que fazem par com a subunidade β 1 (Humphries et al., 2006; Manninen et al., 2016, Pan et al., 2016).

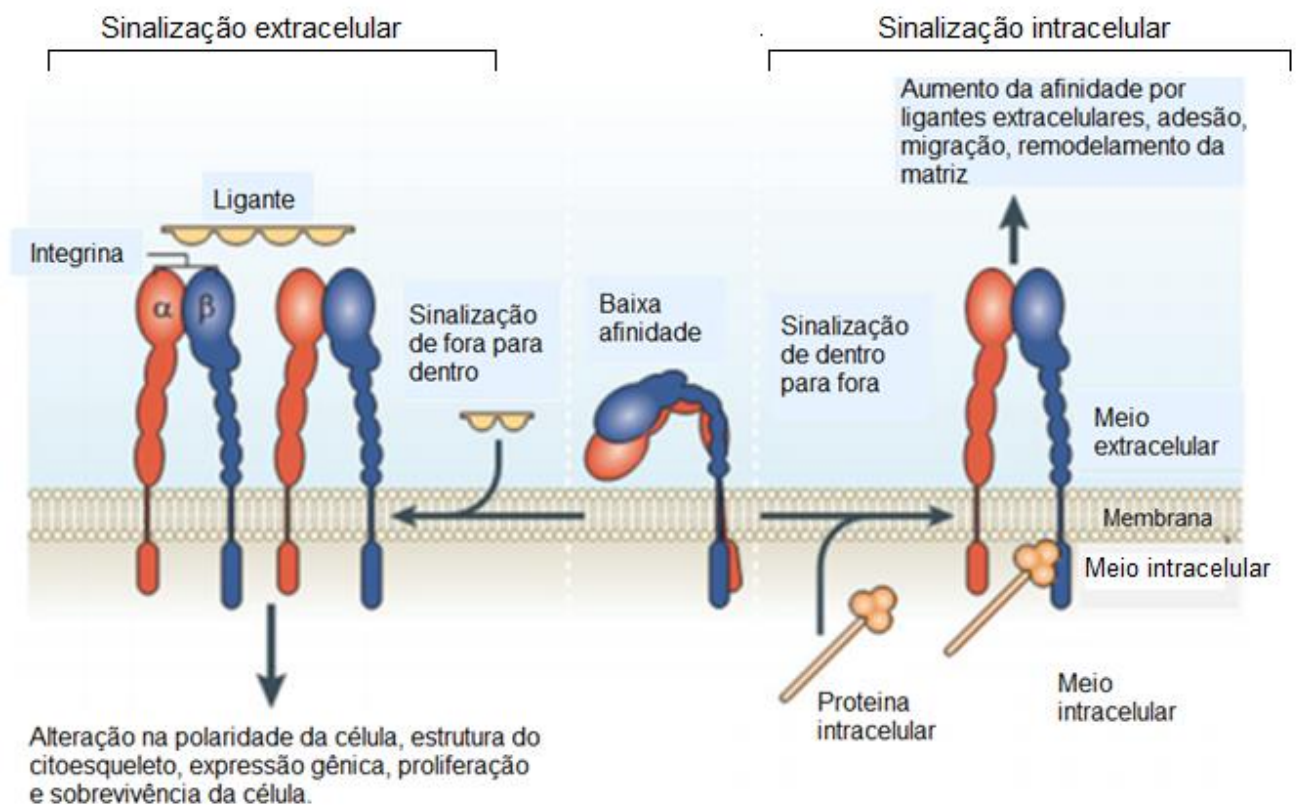


Figura 7. Ativação e sinalização das integrinas. Os receptores de integrinas podem ser ativados de duas formas: No domínio extracelular por proteínas da MEC ou no domínio intracelular por proteínas intracelulares. Dependendo da forma de ativação as consequências fisiológicas são diferentes. Adaptado de Shattil, et al. 2010.

As integrinas sinalizam de forma bidirecional. Isso significa que elas podem transmitir sinais de fora para dentro ou de dentro para fora da célula (Fig 7). Na

sinalização extracelular (*outside-in*), uma proteína da MEC se liga ao domínio extracelular da integrina mudando a sua conformação e podendo levar a alterações na estrutura do citoesqueleto, polaridade, expressão gênica, proliferação e sobrevivência da célula. Na sinalização intracelular (*inside-out*) uma proteína citoplasmática se liga ao domínio citoplasmático da subunidade β promovendo uma mudança na conformação dessa subunidade, aumentando a afinidade dessa integrina por ligantes extracelulares podendo levar a processos de adesão, migração e remodelamento da MEC (Shattil et al., 2010) (Fig. 7).

De maneira geral, as integrinas estão envolvidas com processos de adesão celular que são importantes para migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula (Hynes, 2002).

O colágeno é a proteína mais abundante na matriz extracelular e é importante para adesão, crescimento, migração celular e processos cicatrização. Foram descritos quatro receptores de colágeno que são formados por subunidades de integrina: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ e $\alpha 11\beta 1$. As mais abundantes são as integrinas $\alpha 1\beta 1$ presente em células-tronco mesenquimais, fibroblastos, condrócitos e glóbulos brancos circulantes e a integrina $\alpha 2\beta 1$ encontrada em células epiteliais, plaquetas e fibroblastos. A integrina $\alpha 10\beta 1$ está presente em condrócitos como receptor de colágeno II (Bengtsson et al., 2005; Zeltz C et al., 2016). A expressão de $\alpha 11\beta 1$ está restrita a células do mesenquima em regiões com redes de colágeno bem organizadas e fibroblastos (Popova et al., 2007; Zeltz C et al., 2016). As integrinas são proteínas envolvidas com migração, proliferação e diferenciação celular. É através dessas proteínas de membrana que as MSCs interagem com proteínas de matriz extracelular como o colágeno. Como as integrinas são importantes para que seja possível entender a influência da matriz extracelular sobre as MSC e, por isso foram escolhidas para este trabalho.

2. Objetivo

O objetivo geral deste estudo foi comparar a expressão de subunidades de integrina entre o cultivo convencional das células-tronco mesenquimais de medula óssea e a nova abordagem em matriz de colágeno (3D). As células-tronco mesenquimais são interessantes para o uso em terapia celular e regeneração de tecidos por sua capacidade de diferenciação em vários tipos de células, auto renovação, fácil expansão *in vitro* e propriedades imunorregulatórias.

3. Materiais e Métodos

3.1. Modelo Animal

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com aproximadamente 2 meses de idade, obtidos no Biotério Central da UENF. 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 MSCs

Um rato normal doador foi sacrificado, seus fêmures e tíbias foram dissecados, as epífises foram cortadas para a coleta da medula com o auxílio de uma seringa contendo o meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*) e tubos falcon estéreis. As células foram centrifugadas e suspensas em 6 mL de meio. Esse material foi então centrifugado por 30 minutos a 400 x g em Histopaque 1083, e a porção mononuclear foi separada por gradiente descontínuo de densidade.

As células extraídas foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino, antibióticos penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/mL) e neomicina (50 µg/mL) e antifúngico anfotericina B (25µg.mL⁻¹) na proporção de medula extraída dos 4 ossos de um animal por cada garrafa. A cultura foi mantida em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após dois dias o meio contendo as células não aderidas foi retirado, as garrafas foram lavadas com PBS e um meio novo foi colocado.

A cultura foi mantida até que as MSCs atingissem confluência. Nesse momento, as MSCs foram soltas por tripsinização, utilizando 4 mL de solução contendo 0,25% de tripsina e de EDTA Gibco®, lavadas e plaqueadas de cada garrafa para duas novas. Esse processo foi repetido 3 vezes para que se alcançasse um alto nível de enriquecimento da cultura. As MSCs foram então soltas da placa por tripsinização e suspensas em salina. Foi estimado o número de células viáveis através da análise de viabilidade celular com o corante azul de tripan em câmara de *Neubauer*. Esse

reagente cora apenas células mortas, o que permite que sejam contadas apenas as células viáveis.

3.3. Análise Fenotípica das MSCs

A caracterização imunofenotípica das MSCs foi feita por citometria de fluxo. Foram utilizados anticorpos conjugados com moléculas fluorescentes, próprios para análises por citometria de fluxo, contra os seguintes marcadores:

- Marcadores positivos: anti-CD29 /Integrina β 1/ allophycocyanin (APC) conjugate (*hamster* IgG; 1:60; Molecular Probes) e anti-CD90/fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (mouse IgG1; 1:30; Abcam).
- Marcadores negativos: anti-CD45/phycoerythrin-cyanine 5.5 (PE-Cy5.5) conjugate (mouse IgG1; 1:60; Molecular Probes) e anti-CD11b/ Integrina α M /phycoerythrin-cyanine 5 (PE-Cy5) conjugate (rat IgG2b; 1:60; Abcam).
- 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 terceira passagem, as MSCs foram soltas da placa por tripsinização mantidas em agitação durante duas horas. Após esse período foram lavadas, contadas e separadas em alíquotas de $2,5 \times 10^5$ células, centrifugadas e suspensas com PBS contendo 2% de soro fetal bovino + 0,1% de azida. As células foram incubadas com os anticorpos durante vinte minutos a 4°C, centrifugadas e suspendidas com PBS contendo 2% de soro fetal bovino + 0,1% de azida e levadas para análise em citômetro de fluxo (modelo FACSCalibur da BD Biosciences).

3.4. Obtenção da Matriz de Colágeno e Cultivo Celular

Quando atingiram a terceira passagem, as MSC foram soltas da garrafa por tripsinização, contadas e replaqueadas em uma placa de 24 poços em uma densidade de 10^6 células por poço. Na placa, as células foram cultivadas em colágeno tipo I (cultivo 3D) ou aderidas ao fundo poço (cultivo 2D).

As células foram mantidas nesses poços pelo período de 24 horas. No cultivo em condição 2D, as células foram mantidas em 2,5 ml de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino. No cultivo em condição 3D, para a síntese da matriz de colágeno foram utilizados 31 µl de DMEM/F12 (5x), 25 µl de NaOH 0.1 N, 44 µl de DMEM/F12 (1x) com as células e 100 µl de colágeno tipo I (3 mg/ml; Gibco, Invitrogen), somando um total de 200 µl por poço. Quando distribuídas nos poços, as amostras foram encubadas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por uma hora para a solidificação da matriz de colágeno. Após esse período, foram adicionados 2,5 mL de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino. Esse experimento foi realizado com o material de três animais, e cada tipo de cultivo (2D ou 3D) foi feito em duplicata (dois poços), todos cultivados juntos em uma mesma placa.

3.5. Extração do RNA total e Síntese do cDNA

Após o tempo de cultivo desejado (24h), a extração do RNA total das MSCs foi feita utilizando o kit *Direct-zol™ RNA MiniPrep TRI-Reagent®* (Zymo Research) de acordo com o protocolo do fabricante. Para os poços com colágeno, o material foi congelado com nitrogênio líquido e macerado antes do uso do kit. O RNA resultante foi utilizado para síntese de cDNA utilizando o kit *Verso cDNA Synthesis* (Thermo Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. A ciclagem utilizada está no quadro 1. O cDNA foi quantificado em fotoespectômetro (NanoDrop™) e diluída para 25ng/µl.

Quadro 1. Ciclagem para a síntese do cDNA.

	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
6 µl de água ultrapura 5 µl de amostra Primmer Oligo-Dt	65°C	5 min	1
+			
RT-Enhancer	42°C	30 min	1
Tampão de síntese de cDNA Mix de dNTP Mix de enzima	95°C	2 min	1

3.6. Análise da Expressão de Genes Via PCR Quantitativo

As reações de PCR foram desenvolvidas utilizando-se o kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix; Thermo Scientific seguindo as especificações do fabricante. Em cada poço foram adicionadas 50ng da amostra diluídos em 2µl de água ultrapura, 6.3 µl de *SYBR Green*, 1µl de primer (1µM) e 2.7µl de água ultrapura totalizando 12µl por poço. A ciclagem está resumida no quadro 2.

Quadro 2. Ciclagem utilizada em todos os experimentos de qPCR.

Estágio	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 min	1
Desnaturação	95°C	15 s	40
Anelamento/extensão	60°C	60 s	

As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento StepOnePlus™ (Applied biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo StepOne Software v2.1. (Applied Biosystems). O método de quantificação usado foi o Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Os resultados serão expressos em valor de Ct (Cycle Threshold), que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os valores de fluorescência emitidos na reação de amplificação e o valor Threshold permite determinar o Ct. Foi utilizado um kit personalizado (GenOne Biotechnologies) contendo 90 primers para genes de interesse terapêutico. Foi informado pelo fabricante que os primers têm entre 90 e 110% de eficiência. Foram estudados os genes listados no quadro 3.

Os dados obtidos pelo programa StepOne v2.1 foram exportados para planilha de análise do EXCEL, onde foram feitos os cálculos de quantificação relativa (*fold change*) para cada gene e para cada condição experimental.

Nas análises de gene 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 $p < 0,05$. A análise estatística e a confecção dos gráficos foram feitos no programa *GraphPad Prism* 4.02.

Quadro 3. Subunidades de integrinas que foram analisadas por qPCR.

Abreviatura	Nome
ITGA1	Integrina alpha 1
ITGA2	Integrina alpha 2
ITGA3	Integrina alpha 3
ITGA4	Integrina alpha 4
ITGA5	Integrina alpha 5
ITGA6	Integrina alpha 6
ITGA7	Integrina alpha 7
ITGA8	Integrina alpha 8
ITGA9	Integrina alpha 9
ITGA10	Integrina alpha 10
ITGA11	Integrina alpha 11
ITGAD	Integrina alpha D
ITGAL	Integrina alpha L
ITGAM	Integrina alpha M
ITGAV	Integrina alpha V
ITGAX	Integrina alpha X
ITGB1	Integrina beta 1
ITGB2	Integrina beta 2
ITGB3	Integrina beta 3
ITGB4	Integrina beta 4
ITGB5	Integrina beta 5
ITGB6	Integrina beta 6
ITGB7	Integrina beta 7
ITGB8	Integrina beta 8

3.7. Escolha do gene controle

Seis genes foram testados com o objetivo de escolher o gene com menor variação de expressão entre as duas condições. Os genes testados estão listados no quadro 4.

Quadro 4. Listagem de genes testados para controle endógeno

Abreviatura	Nome
B2M	Beta-2 microglobulina
ACTB	Beta actina
GUSB	Glucuronidase beta
PPIA	Peptidil-prolil-isomerase A
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
PGK1	Fosfoglicerato quinase 1

4. Resultados

4.1. Caracterização das MSCs por citometria de fluxo

Os marcadores positivos CD29 (integrina $\beta 1$) e CD90 foram identificados em 97,71% e 95,44% das células da amostra respectivamente, refletindo o padrão característico das MSCs (Fig. 8A e B). Aproximadamente 2,03% e 2,76% das células foram positivas para CD45 e CD11b (integrina αM) respectivamente. Esses anticorpos foram usados como marcadores negativos (Fig. 8C e D). Estes resultados, junto com outras características observadas nas MSCs, como morfologia semelhante a fibroblastos e alta aderência ao plástico, indicam que nossa cultura foi altamente enriquecida em MSCs após a terceira passagem.

A eficácia dos marcadores negativos foi comprovada utilizando células mononucleares de medula óssea, que expressam o marcador CD45 e macrófagos peritoneais que expressam o marcador CD11b. 91,75% das células mononucleares marcaram para o marcador CD45 (Fig. 10) e 93,72% dos macrófagos marcaram para CD11b (Fig. 11).

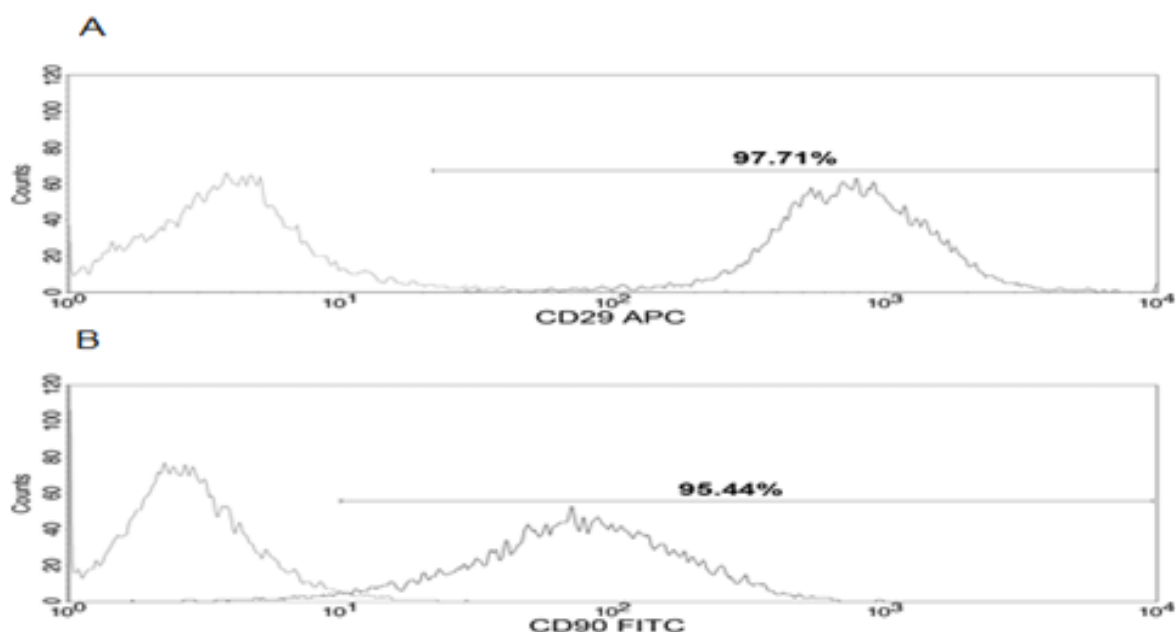


Figura 8. Análise da expressão de CD29 e CD90 na superfície de células-tronco mesenquimais de medula óssea por citometria de fluxo. Linha cinza claro, controle de isoforma; linha cinza escuro, marcador específico. Os marcadores CD29 e CD90 foram usados como marcadores positivos. O marcador CD29 foi identificado em 97,71% das células e o CD90 em 95,44%.

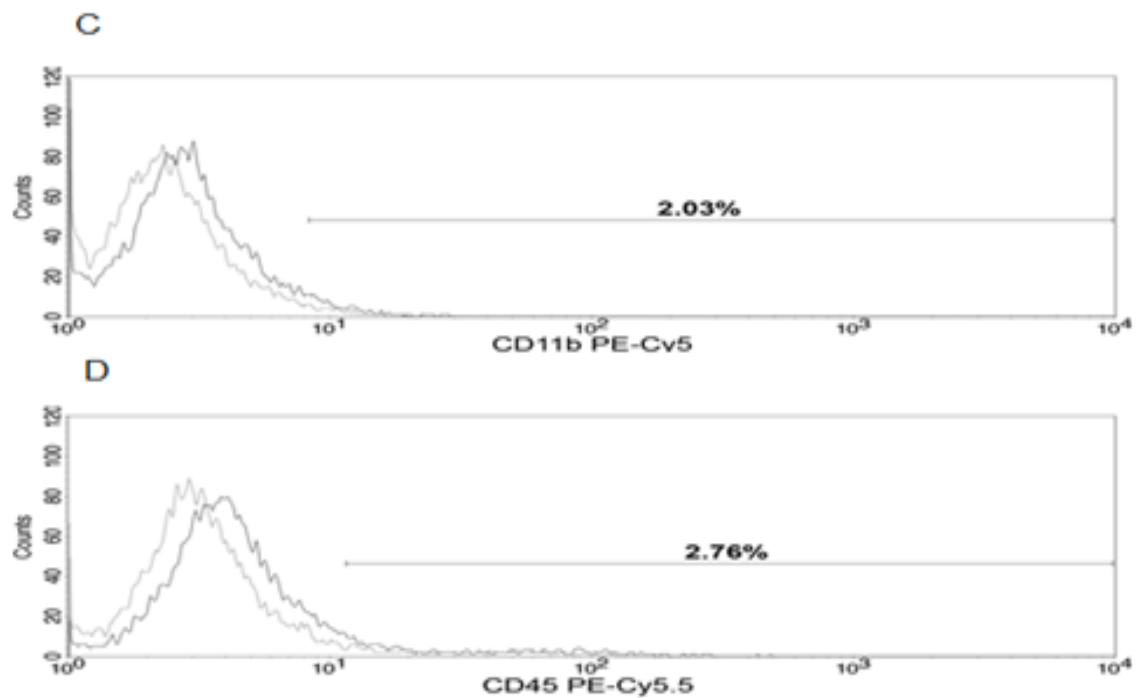


Figura 9. Análise da expressão de CD11b e CD45 na superfície de células-tronco mesenquimais de medula óssea por citometria de fluxo. Linha cinza claro, controle de isoforma; linha cinza escuro, marcador específico. (C) Cerca de 2,03% das células foram positivas para CD11b e (D) 2,76% das células marcaram com o anticorpo anti-CD45, usados como marcadores negativos.

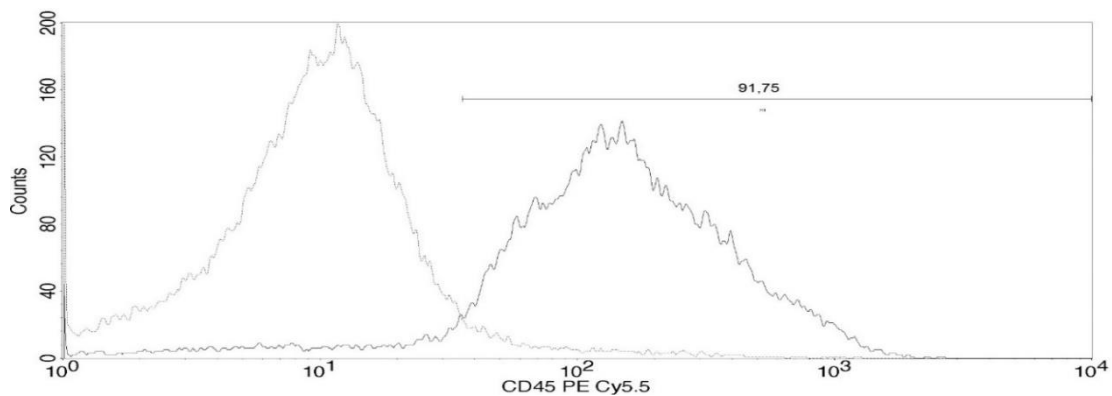


Figura 10. Análise da expressão do marcador CD45 em células mononucleares de medula óssea de rato por citometria de fluxo. Linha cinza claro, controle de isoforma; linha cinza escuro, marcador específico. O marcador CD45 foi expresso em 91,75% das células.

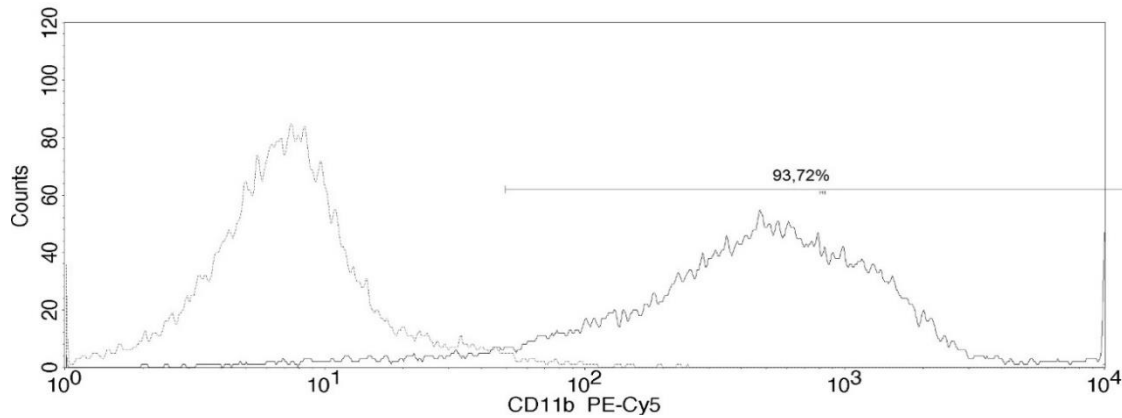


Figura 11. Análise da expressão do marcador CD11b em macrófagos peritoneais de camundongos por citometria de fluxo. Linha cinza claro, controle de isoforma; linha cinza escuro, marcador específico. O marcador CD11b foi expresso em 93,72% das células.

4.2. Análise da expressão do gene de referência

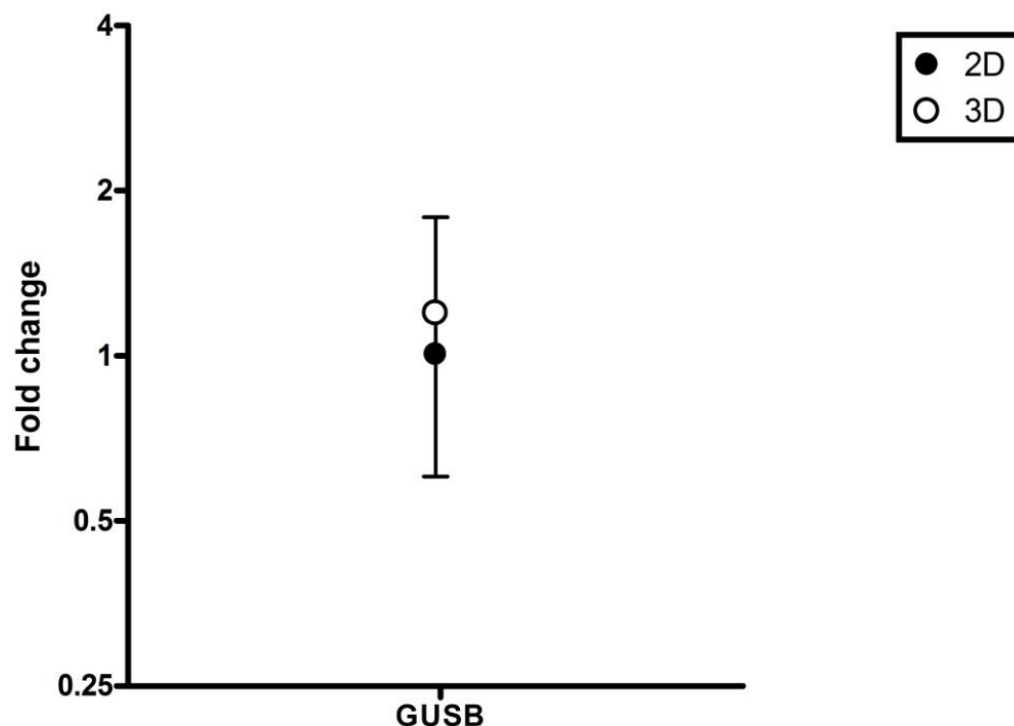


Figura 12. Análise da expressão do gene de referência. Não foi observada diferença significativa na expressão do gene de referência GUSB entre as duas condições experimentais. (* = $p < 0,05$; teste t). Os pontos com as barras de erro representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). GDNF, $p = 0,8$; NTF4, $p = 0,7$; teste t.

Neste estudo foram testados os genes GAPDH, PPIA, PGK1, B2M, GUSB e ACTB para a escolha do gene controle para as condições com e sem colágeno. nos experimentos de PCR quantitativo. Dos genes testados, o GUSB não apresentou diferença significativa na expressão na condição 2D e 3D (Fig. 12). Com base nesta análise e em estudo anterior, o gene GUSB foi escolhido como controle endógeno (Cunha, 2016).

4.3. Análise da expressão das subunidades de integrina no cultivo 2D e 3D

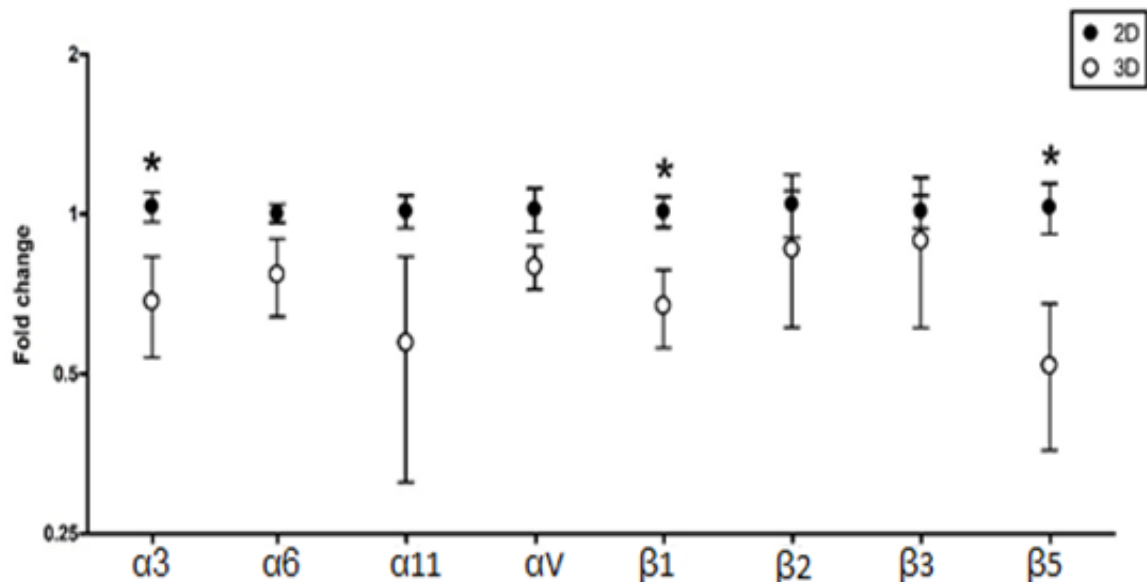


Figura 13. Análise das subunidades de integrina. Das subunidades de integrina testadas apenas oito apareceram em todas as culturas testadas. Dessas oito subunidades apenas as subunidades α3, β1 e β5 apresentaram diferença de expressão entre os cultivos 2D e 3D. (* = $p < 0,05$; teste t). Os pontos com as barras de erro representam a média ± desvio padrão ($n = 3$). GDNF, $p = 0,8$; NTF4, $p = 0,7$; teste t.

Os genes α1, α4, α7, α9, α10, αL, αM, αX, β4, β6 e β7 não apresentaram expressão em nenhuma das condições de cultivo. Os genes α2, α5 e β8 apareceram em apenas duas culturas. Os genes α8 e αD apareceram em apenas uma das culturas analisadas. Os genes de α6, α11, αV, β2 e β3 expressaram em todas as três culturas porém não apresentaram diferença de expressão significativa entre as duas condições de cultivo (Fig. 13). Houve diminuição significativa na expressão dos genes de α3, β1

e $\beta 5$ na condição 3D (Fig. 13). O Quadro 5 mostra o resumo de todos os resultados da análise de expressão gênica realizada em nosso estudo.

Quadro 5. Resultado das análises de PCR quantitativo. Oito subunidades de integrina expressaram nas três culturas, três subunidades apareceram em apenas duas culturas, duas expressaram em apenas uma cultura e onze subunidades não expressaram.

Gene (sigla)	Número de culturas em que ocorreu expressão (n=3)	Condições em que ocorreu expressão	Resultado da expressão*
$\alpha 1$	0	n/a	inconclusivo ¹
$\alpha 2$	2	3D/todas	inconclusivo ²
$\alpha 3$	3	Todas	-
$\alpha 4$	0	n/a	inconclusivo ¹
$\alpha 5$	2	2D	inconclusivo ²
$\alpha 6$	3	Todas	sem alteração
$\alpha 7$	0	n/a	Inconclusivo ¹
$\alpha 8$	1	2D	inconclusivo ²
$\alpha 9$	0	n/a	Inconclusivo ¹
$\alpha 10$	0	n/a	inconclusivo ¹
$\alpha 11$	3	Todas	sem alteração
αD	1	2D	inconclusivo ²
αL	0	n/a	inconclusivo ¹
αM	0	n/a	Inconclusivo ¹
αV	3	Todas	sem alteração
αX	0	n/a	Inconclusivo ¹
$\beta 1$	3	Todas	-
$\beta 2$	3	Todas	sem alteração
$\beta 3$	3	Todas	sem alteração
$\beta 4$	0	n/a	inconclusivo ¹
$\beta 5$	3	Todas	-
$\beta 6$	0	n/a	Inconclusivo ¹
$\beta 7$	0	n/a	Inconclusivo ¹
$\beta 8$	2	2D	inconclusivo ²

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

-: redução.

Inconclusivo¹: aparente ausência de expressão, mas ainda é necessário fazer a validação do resultado pela comprovação da eficácia do primer utilizado através da demonstração de amplificação com amostras de controles positivos.

Inconclusivo²: inconsistência no aparecimento de amplificação, por razões desconhecidas, o que impede de se chegar a uma conclusão confiável.

5. Discussão

Neste estudo foi analisada a expressão de subunidades de integrinas em MSCs de medula óssea no cultivo tradicional em placa de cultura (2D) e, no cultivo em matriz de colágeno (3D), que além de oferecer o suporte químico do cultivo em placa também oferece suporte mecânico as células promovendo maior interação célula-célula e célula-matriz, se aproximando do ambiente natural celular.

Das subunidades de integrinas estudadas, as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, αL , αM , αX , $\beta 4$, $\beta 6$ e $\beta 7$ não apareceram em nenhuma condição estudada. Já era esperado que algumas subunidades como αL , αM e αX não expressassem pois são encontradas exclusivamente em células de defesa (Hynes, 2002). Outras integrinas foram expressas em uma ou duas culturas. As subunidades $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 11$, αV , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 5$ expressaram nas duas condições estudadas e em todas as três culturas, porém as únicas subunidades que apresentaram diferença de expressão significativa entre a condição sem colágeno (2D) e a condição com colágeno (3D) foram as subunidades $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 5$. Essas subunidades foram menos expressas na condição 3D do que na condição 2D. Também foi observado, por análise em citômetro de fluxo, que as subunidades αM e $\beta 1$ estão respectivamente ausente e presente na membrana da célula sugerindo que os resultados observados por qPCR podem ser confirmados por outras metodologias.

De acordo com os resultados, o único receptor de colágeno que essas células poderiam estar expressando na membrana é o receptor $\alpha 11\beta 1$ já que as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 10$ não expressaram em nenhuma condição. O receptor $\alpha 11\beta 1$ parece estar restrito a células mesenquimais não musculares (Popova et al., 2007). A integrina $\alpha 11\beta 1$ tem especificidade para colágeno I mas também pode se ligar a colágeno IV com pouca afinidade. Está associada com migração celular e reorganização da matriz de colágeno em estudos *in vitro* (Vuoristo et al., 2007). A subunidade $\beta 1$ é a única subunidade β conhecida até o momento que possui relação com o colágeno e, por isso, era esperado que essa integrina expressasse nessas células. No nosso estudo foi comprovada a presença dessa integrina que foi identificada por qPCR em todas as condições e culturas expressando mais na condição 2D. Essas observações corroboram com os resultados obtidos por Zhou et al., 2016. No referido estudo foi

identificada a diminuição da expressão da subunidade $\beta 1$ na membrana celular de MSCs humanas cultivadas em ambiente 3D. É possível que a expressão de $\beta 1$ não esteja diminuindo na condição 3D mas sim aumentando na condição 2D. Já foi identificado que o cultivo 2D pode aumentar a expressão da subunidade $\beta 1$ em MSCs (Wang et al., 2015).

A subunidade $\beta 5$ foi expressa na condição 2D e 3D. Essa subunidade também está presente em células de crista neural, vasos sanguíneos e tumores por exemplo (Memmo et al., 1998; Hu et al. 2014). A subunidade $\beta 5$ forma receptor de vitronectina com a subunidade αV (Memmo et al., 1998). Já foi identificado que essa subunidade é menos expressa na condição 3D (Wang et al, 2015). Outros estudos também mostraram a presença dessa subunidade na condição 2D na membrana de MSCs por análise em citômetro de fluxo ou do transcriptoma da célula por análise *microarray* (Brooke et al. 2008; Chastain et al. 2006; Djouad et al. 2007; Lee et al. 2008).

A subunidade $\alpha 3$ já foi descrita como expressa em MSCs (Brooke et al. 2008; Delorme et al. 2008) em aproximadamente 80% das células (Semon et al., 2010). Essa subunidade se encontra associada com $\beta 1$ na superfície celular formando receptor de laminina e fibronectina que é uma glicoproteína presente na matriz extracelular que tem um papel importante na organização da matriz extracelular, adesão, migração, morfologia e organização do citoesqueleto (Hynes et al., 2002; Labat-Robert, 2012). Já foi demonstrado por Wang et al., 2015 que a subunidade $\alpha 3$ é menos expressa por MSCs na condição 3D do que na condição 2D. Esse resultado também pode ser observado no presente estudo.

Neste estudo também foi observada a expressão de $\alpha 5$ que, junto com a subunidade $\beta 1$ é um receptor de fibronectina (Labat-Robert, 2012). A subunidade $\alpha 5$ já foi descrita como presente em MSCs na condição 2D (Vohra et al. 2008; Brooke et al., 2008 ; Chen et al., 2008; Sackstein et al., 2008). Neste estudo essa integrina expressou apenas na condição 2D em duas das culturas testadas. Em Wang et al., 2015 foi identificado que MSCs cultivadas em 2D tem a expressão da subunidade $\alpha 5$ aumentada. Esse resultado corrobora com o observado neste estudo.

As subunidades $\beta 2$ e $\beta 3$ já foram descritas na condição 2D como ausentes (Goessler et al., 2006; Brooke et al., 2008; Sackstein et al., 2008) ou presentes (Brooke et al., 2008 ; Chen et al., 2008; Delorme et al., 2008) em vários estudos com MSCs. No presente estudo essas subunidades expressaram em todas as culturas e condições. Já foi demonstrado que a subunidade $\beta 3$ expressa menos na condição 3D

e que a subunidade $\beta 2$ praticamente não expressa nessa condição (Wang et al., 2015). Esses resultados não corroboram com os achados no presente estudo.

Em Semon et al., 2010 já foi identificado que culturas subconfluentes de células-tronco mesenquimais humanas expressam as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, e $\alpha 3$ em 80% das células, 20%–55% das células expressaram $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, e αV . Apenas 10% das células expressaram $\beta 3$. As outras 13 subunidades não foram expressas na membrana dessas células quando analisadas por citometria de fluxo e as subunidades $\beta 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 11$, αX , e αD apareceram apenas quando analisadas por imunohistoquímica (Semon et al., 2010).

Os resultados referentes a expressão das subunidades de integrina $\beta 3$, $\beta 5$, $\alpha 1$, $\alpha 4$ e αV foram diferentes dos observados por Semon et al., 2010. Essa diferença pode ser explicada por mudanças no método de cultivo, densidade da cultura e tempo de cultivo que podem modificar o padrão de expressão de integrinas. Além disso, diferentes primers para análise quantitativa do RNA e anticorpos com diferentes epítomos para a detecção de integrinas na superfície celular podem também levar a resultados conflitantes dificultando a comparação com outros trabalhos (Semon et al., 2010; Lee et al., 2013).

A subunidade $\alpha 2$ foi expressa em duas culturas na condição 2D e em uma cultura na condição 3D. Já foi observada a expressão dessa subunidade em MSCs. No cultivo 3D houve redução da expressão dessa integrina (Wang et al., 2015). Junto com a subunidade $\beta 1$, a subunidade $\alpha 2$ forma um receptor de colágeno (Hynes, 2002; Zeltz et al., 2016). Esse receptor está presente em plaquetas, fibroblastos, células epiteliais e vasculares (Zeltz et al., 2016).

A diminuição da expressão das subunidades de integrina $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 5$ e a não expressão das subunidades $\alpha 5$ e $\beta 8$ (expressas em 2D) não significa que o cultivo 3D é ineficiente pois é conhecido que o cultivo 2D pode modificar a expressão dessas subunidades. Se essas alterações são promovidas pelo cultivo 2D, então, é possível que as células cultivadas no modelo 3D estejam expressando essas proteínas de maneira próxima do que pode ser observado *in vivo*.

6. Conclusão

Nesse trabalho foi possível concluir que existem diferenças na expressão de subunidades de integrina entre MSCs cultivadas em matriz de colágeno e no cultivo convencional. As subunidades de integrina $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\beta 5$ foram mais expressas nas células cultivadas no modelo de cultivo 2D quando comparadas com as MSCs cultivadas em 3D. Esses resultados já foram observados por outros autores utilizando MSCs de diferentes origens. Não é possível saber se a modificação da expressão dessas subunidades de integrina é positiva para o tratamento com células-tronco mesenquimais mas é possível que essas subunidades de integrina modifiquem o fenótipo da célula por participarem de processos como adesão, proliferação, diferenciação e migração celular.

7. Bibliografia

- Aggarwal S & Pittenger MF (2005). **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood* 105, 1815–1822
- Baker BM, Chen CS (2012). **Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues.** *J Cell Sci* 125(13): 3015–3024.
- Barczyk, M, Carracedo S and Gullberg D (2010). **Integrins.** *Cell Tissue Res.*339, 269-280.
- Barry FP , Murphy JM (2004). **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.** *Int J Biochem Cell Biol.* 36(4):568-84.
- Bengtsson T, Aszodi A, Nicolae C, Hunziker EB, Lundgren-Åkerlund E, Fässler R (2005). **Loss of $\alpha 10\beta 1$ integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes.** *J Cell Sci* 118: 929-936;
- Bernemann C, Greber B, Ko K, Sternecker J, Han DW, Araúzo-Bravo MJ (2011). **Distinct developmental ground states of epiblast stem cell lines determine different pluripotency features.** *Stem Cells* 29(10):1496-1503.
- Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K (2008) **Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta.** *Stem Cells Dev* 17:1039–1041
- Caplan AI (1991). **Mesenchymal stem cells.** *J. Orthop. Res.* 9: 641–650
- Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL (2013). **Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: are view of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells.** *Frontiers in Neuroscience | Neuroendocrine Science.* doi: 10.3389/fnins.2013.00194
- Chastain SR, Kundu AK, Dhar S, Calvert JW, Putnam (2006) **Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation.** *J Biomed Mater Res A* 78:73–85
- Chen CP, Lee MY, Huang JP, Aplin JD, Wu YH, Hu CS, Chen PC, Li H, Hwang SM, Liu SH, Yang YC (2008) **Trafficking of multipotent mesenchymal stromal cells from maternal circulation through the placenta involves vascular endothelial growth factor receptor-1 and integrins.** *Stem Cells* 26:550–61

- Chen CY, Cheng YY, Yen CY, Hsieh PC (2016) **Mechanisms of pluripotency maintenance in mouse embryonic stem cells.** *Cell Mol Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-016-2438-0.
- Chopp M, Li Y (2002). **Treatment of neural injury with marrow stromal cells.** *Lancet Neurol.* 1(2):92-100.
- Clements LE, Garvican ER, Dudhia J, Smith RKW (2016): **Modulation of mesenchymal stem cell genotype and phenotype by extracellular matrix proteins.** *Connective Tissue Research*, DOI: 10.1080/03008207.2016.1215442
- Cunha, Igor A. G. **Análise comparativa da expressão gênica de citocinas, fatores neurotróficos e receptores por células-tronco mesenquimais cultivadas em matriz bidimensional e tridimensional de colágeno.** 2016. (Mestre em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Página 31.
- Da Silva J T, Grecco M R, Coutinho VSB, Pereima MJ, Leonardi DF, Goncalves TA (2014). **Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration.** *PLoS ONE* 9:e89542.
- De Freitas HT, Da Silva VG, Giral-di-Guimarães A (2012), **Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats.** *Behav Brain Funct* 8:58.
- De Freitas HT, Rebel MG, Coelho BP, Da Silva VG, Almeida GGCG, Giral-di-Guimarães A (2014). **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* 348: 166–173
- De Vasconcelos Dos Santos A, Da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giral-di-Guimarães A, Mendez-Otero R (2010) **Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats.** *Brain Research.* 1306: 149-158.
- Deans RJ, Moseley AB (2000). **Mesenchymal Stem Cells: biology and potential clinical uses.** *Exp Hematol* 28: 875-884.
- DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, Menta R (2009). **Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression**

in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 15: 2795–2806.

Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, Charbord P (2008) **Specific plasma membrane protein phenotype of culture amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells.** *Blood* 111:2631–2635

Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louisplence P, Canovas F, Charbord P, Noël D, Jorgensen C (2007) **Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 9: R33

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF & Keiliss-Borok IV (1974). **Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo.** *Transplantation* 17: 331-340.

Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB (2012). **Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis.** *Allergy* 67: 1215–1222.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004). **Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.** *Cell*. 19;116(6):769-78.

Giunti D., Parodi B, Usai C, Vergani L, Casazza S, Bruzzone S, Mancardi G, Uccelli A (2012). **Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1.** *Stem Cells*, 30, pp. 2033–2053

Glenn JD, Whartenby KA (2014). **Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy.** *World J Stem Cells*. 6(5): 526-539

Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Stern-Straeter J, Bran G, Hörmann K, Riedel F (2008). **Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation.** *J Mol Med*. 21(3):271-9.

Han KH, Ro H, Hong JH, Lee EM, Cho B, Yeom HJ (2011). **Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response.** *Transplant Immunol* 25:7-15.

Haque MA, Nagaoka M, Hexig B, Akaike T (2010). **Artificial extracellular matrix for embryonic stem cell cultures: a new frontier of nanobiomaterials.** *Sci Technol Adv Mater* 11(1): 014106.

- Hu JX, Niu MM, Li XY, Lu DY, Cui J, Xu WJ, Li G, Zhan J, Zhang HQ (2014a) **FERM domain-containing protein FRMD5 regulates cell motility via binding to integrin β 5 subunit and ROCK1.** *FEBS Lett* 588:4348–4356
- Hu MS, Maan ZN, Wu JC, Rennert, RC, Hong WX, Lai TS (2014b). **Tissue engineering and regenerative repair in wound healing.** *Ann. Biomed. Eng.* 42, 1494–1507.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006). **Integrin ligands at a glance.** *J Cell Sci.* 1;119(Pt 19):3901-3.
- Hynes, RO (2002). **Integrins: bidirectional, allosteric machines.** *Cell.* 110, 673-687
- Hynes, RO (2007). **Cell-matrix adhesion in vascular development.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 (Suppl. 1): 32–40
- Hynes, RO (2009). **The extracellular matrix: not just pretty fibrils.** *Science* 326, 1216-1219
- Isakson, M., de Blacam, C., Whelan, D., McArdle, A., and Clover, A. J. P. (2015). **Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential.** *Stem Cells Int.* 831095.
- Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS (2012). **Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells.** *Stem Cells Transl Med.* 1(1):44-50.
- Kim EJ, Kim N, Cho SG (2013). **The potencial use of mesenchymal stem calls in hematopoietic stem cell transplantation.** *Experimental e Molecular Medicine* 45: 1-10.
- Kim K, Utoh R, Ohashi K, Kikuchi T, Okano T (2015). **Fabrication of functional 3D hepatic tissues with polarized hepatocytes by stacking endothelial cell sheets in vitro.** *J Tissue Eng Regen Med.* DOI: 10.1002/term.2102.
- Khetan S, Burdick JA (2010). **Patterning Network Structure to Spatially Control Cellular Remodeling and Stem Cell Fate within 3-Dimensional Hydrogels.** *Biomaterials*, 31:8228-8234.
- Kong YP, Tu CH, Donovan PJ, Yee AF (2013). **Expression of Oct4 in human embryonic stem cells is dependent on nanotopographical configuration.** *Acta Biomater* 9:6369e80.

- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E (2003). **Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.** *Blood* 101: 3722–3729.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A (2006). **Role for interferon gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells.** *Stem Cells* 24: 386-398.
- Labat-Robert J (2012). **Cell-Matrix interactions, the role of fibrinectin and integrins. A survey.** *Pathol. Biol.* 60(1):15-9. doi: 10.1016
- Latsinik NV, Sidorovich Slu, Fridenshtein Aia (1981). **Effect of bone marrow trypsinization on the efficiency of fibroblast colony formation in monolayer cultures.** *Biull Eksp Biol Med.*;92(9):356-358.
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA (2008) **Three-dimensional cell culture matrices: state of the art.** *Tissue Eng.* 14:61-86, 2008.
- Lee MW, Kim DS, Yoo Kh, Kim HR, Jang IK, Lee JH, Kim SY, Son MH, Lee SH, Jung Hl, Sung KW, Koo HH (2013). **Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions.** *Blood Res.* 48(2):107-14
- Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ (2008) **The CD34-like protein PODXL and α 6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice.** *Blood* 113:816–826
- Lee Tao-Chen , Tsung-Han Lee, Yu-Hua Huang, Nyuk-Kong Chang, Yu-Jun Lin, Pei-Wen Chang Chien, Wei-Hsun Yang, And Martin Hsiu-Chu Lin (2014). **Comparison of Surface Markers between Human and Rabbit Mesenchymal Stem Cells.** *PLoS One.* 9(11): e111390.
- Leonardi D, Oberdoerfer D, Fernandes MC, Meurer RT, PereiraFilho GA, Cruz, P, (2012). **Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds.** *Burns* 38, 1143–1150.
- Li Z, Gong YW, Sun SJ, Du Y, Lu DY, Liu XF, et al. (2013). **Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells.** *Biomaterials* 34:7616e25.
- Li N, Hua J (2017) **Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system.** *Cell. Mol. Life Sci.* DOI 10.1007/s00018-017-2473-5

- Lindsay SL, Barnett SC (2016). **Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair?** , *Neurochemistry International*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.08.001>
- Manninen A (2015). **Epithelial polarity – Generating and integrating signals from the ECM with integrins.** *Experimental Cell Research* 334: 337 – 349
- Manninen A, Varjosalo M (2016). **A proteomics view on integrin-mediated adhesions.** *Proteomics* doi: 10.1002/pmic.201600022.
- Memmo LM, McKeown-Longo P (1998) **The alphavbeta5 integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin.** *J Cell Sci* 111:425–433
- Munger, JS and Sheppard, D (2011). **Cross talk among TGF-beta signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix.** *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005017
- Murray JW, Han D, Wolkoff AW (2014). **Hepatocytes maintain greater fluorescent bile acid accumulation and greater sensitivity to drug-induced cell death in three-dimensional matrix culture.** *Physiol Rep.*18;2(12). pii: e12198.
- Nauta AJ, Fibbe WE (2007). **Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells.** *Blood* 110:3499-3506
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE (2006). **Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells.** *J Immunol* 177: 2080–2087.
- Owen SC, Shoichet MS (2010) **Design of Three-Dimensional Biomimetic Scaffolds.** *Journal of Biomedical Materials Research* Vol 94a, Issue 4
- Pan L, Zhao Y, Yuan Z, Qin G (2016). **Research advances on structure and biological functions of integrins.** *SpringerPlus* 5:1094
- Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P (2008) **Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications.** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 56: 1-8.
- Pawelec KM, Best SM, Cameron RE (2016).**Collagen: a network for regenerative medicine.** *J Mater Chem B Mater Biol Med.* 2016 Oct 28;4(40):6484-6496.
- Pittenger Mf, Mackay Am, Beck Sc, Jaiswal Rk, Douglas R, Mosca Jd, Moorman Ma, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). **Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.** *Science* : Vol. 284, Issue 5411, pp. 143-147

- Popova SN, Barczyk M, Tiger CF, Beertsen W, Zigrino P, Aszodi A (2007) **Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor.** *Mol Cell Biol* 27:4306–4316
- Prockop DJ. (1997) **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** *Science*. 276:71-74.
- Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F (2007). **Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle.** *Transplantation* 83, 71–76.
- Regulski MJ, DPM, ABMSP, CMET, FAPWH, FASPM (2016). **Mesenchymal Stem Cells: “Guardians of Inflammation”.** *Wounds*. Jan;29(1):20-27
- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R.. (2006). **Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells.** *Blood* 108, 3938–3944
- Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R (2008) **Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone.** *Nat Med* 14:181–7
- Sandu RE , Balseanu AT, Bogdan C , Slevin M ,Petcu E , Popa-Wagner A (2017). **Stem cell therapies in preclinical models of stroke. Is the aged brain microenvironment refractory to cell therapy?** *Exp. Gerontol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.008>
- Schipani E, Kronenberg HM (2009). **Adult mesenchymal stem cells.** *StemBook, Harvard Stem cell institute.*
- Schweizer R, Kamat P, Schweizer D, Dennler C, Zhang S, Schnider JT, Salemi S, Giovanoli P, Eberli D, Enzmann V, Erni D, Plock Ja (2014). **Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner.** *Cytotherapy*, 0: 1e16
- Schiwindt TT, Barnabé GF, Mello LEAM (2005). **Proliferar ou diferenciar? Prespectivas de destino das células-tronco.** *Jornal brasileiro de neurocirurgia* 16(1): 13-19.
- Semon JA, Nagy LH, Llamas CB, Tucker AH, Lee RH, Prockop DJ (2010). **Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels.** *Cell Tissue Res* 341:147–158

- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010). **The final steps of integrin activation: the end game.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(4): 288–300.
- Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE (2008). **Integrins: the keys to unlocking angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(10):1703-13
- Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 284: 143-147.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L (2008). **Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2.** *Blood* 111, 1327–1333.
- Spaggiari, GM, Capobianco, A, Becchetti, S, Mingari, MC & Moretta, L (2006). **Mesenchymal stem cell– natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.** *Blood* 107, 1484–1490.
- Su J, Chen X, Huang Y, Li W, Li J, Cao K, Cao G, Zhang L, Li F, Roberts Ai, Kang H, Yu P, Ren G, Ji W, Wang Y, Shi Y (2014). **Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species.** *Cell Death & Differentiation.* 21(3):388–396
- Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS (2012). **Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice.** *Stem Cells* 30: 2692–2699.
- Suh HN, Han HJ (2011). **Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through alpha 2 beta 1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1.** *J Cell Physiol* 226:3422e32.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006). **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 126,663–676.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS (1998). **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science.*; 282(5391):1145–1147.
- Treyer, A, and A Musch (2013). **Hepatocyte polarity.** *Compr. Physiol.* 3:243–287.
- Tsai MJ, Tsai SK, Hu BR, Liou DY, Huang SL, Huang MC, Huang WC, Cheng H, Huang SS (2014) **Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats.** *J Biomed Sci.* 22;21:5.

- Tse WT, Pendleton JD, Egalka MC, Guinan EC (2003). **Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation.** *Transplantation* 75: 389-397.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008). **Mesenchymal stem cells in health and disease.** *Nat Rev Immunol.* 8(9):726-36.
- Vohra S, Hennessy KM, Sawyer AA, Zhuo Y, Bellis SL (2008) **Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite.** *J Mater Sci Mater Med* 19:3567– 3574
- Vuoristo M, Vihinen P, Vlaykova T, Nylund C, Heino J, Pyrhonen S (2007) **Increased gene expression levels of collagen receptor integrins are associated with decreased survival parameters in patients with advanced melanoma.** *Melanoma Res* 17:215–223
- Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T (2008). **Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model.** *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 7: 29-33.
- Wang S, Guo L, Ge J, Yu L, Cai T, Tian R, Jiang Y (2015). **Excess integrins cause lung entrapment of mesenchymal stem cells.** *Stem Cells.* 33: 3315–26.
- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N (2010). **Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing.** *Cell Transplant;* 19: 667–679.
- Zahorec, P, Koller, J, Danisovic, L, and Bohac, M (2015). **Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy.** *Cell Tissue Bank.* 16: 19-26.
- Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G (2013). **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors.** *Stem Cell Research and Therapy.* 4(3, article 70).
- Zhang Y and Stefanovic B (2016). **LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression.** *Int J Mol Sci.* 17(3): 419.
- Zeltz C, Gullberg D (2016). **The integrin-collagen connection--a glue for tissue repair?** *J Cell Sci.* 15;129(4):653-64.
- Zhou Y, Chen H, Li H, Wu Y (2016) **3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension.** *J Cell Mol Med*

