

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

IGOR AUGUSTO GUSMAN CUNHA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
CITOCINAS, FATORES NEUROTRÓFICOS E RECEPTORES
POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM
MATRIZ BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2016**

IGOR AUGUSTO GUSMAN CUNHA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS,
FATORES NEUROTRÓFICOS E RECEPTORES POR CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM MATRIZ BIDIMENSIONAL E
TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO**

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

Orientador: Prof. Dr. Arthur Giraldo Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO DE 2016

Dedico esta conquista aos meus amados pais,
Jaime e Márcia, ao meu irmão Ian,
e a minha namorada, Isabelle.

AGRADECIMENTOS

Embora a dissertação seja um trabalho acadêmico, é importante saber reconhecer e agradecer a todos que contribuíram para que ele se concretizasse.

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade, sabedoria, força, familiares e amigos com quem pude sempre contar.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Jaime Augusto Cunha Filho e Márcia Aparecida A. Gusman Cunha, ao meu irmão, Ian Augusto Gusman Cunha, e à minha namorada, Isabelle Silva Paravidino, por todo amor, apoio, paciência e dedicação. Sem eles eu não teria chegado até aqui.

Ao Professor Dr. Arthur Giraldo Guimarães pela orientação, paciência, oportunidade e por ter me recebido de forma tão acolhedora em sua equipe.

Ao revisor professor Dr. Renato Augusto DaMatta pelo dedicado trabalho que tanto contribuiu na elaboração deste documento.

Aos membros da banca examinadora: Dr^a Hérica Chagas Madureira, Dr^a Elena Lassounskaia e Dr^a Beatriz dos Santos Ferreira, por se disponibilizarem a avaliar este trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório. Em especial à Gisela Garcia Cabral Galaxe de Almeida, que me ajudou enormemente nestes últimos meses, à Rita de Kássia Xavier Pereira e à Maria de Fátima dos Santos Sampaio.

Ao Professor Álvaro Fabrício Lopes Rios e suas alunas Paula e Mariana, que se disponibilizaram a nos auxiliar na realização dos experimentos de *real time* PCR.

Aos amigos que me incentivaram a seguir neste caminho. Incluo aqui os novos amigos feitos na UENF e aos da graduação. Neste último grupo, agradeço aos *Octies* (incluindo-se agregados), em especial ao Vinicius de Oliveira Mussi, que ouviu minhas lamentações e dificuldades, mas me incentivou a prosseguir. Além destes, aos queridos Prof^a Janice Ribeiro, Prof^a Beatriz Ferreira e Prof. Messias Perim, por me incentivarem a nadar contra a corrente e seguir o caminho acadêmico.

A UENF e ao Centro de Biociências e Biotecnologia por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este trabalho, e aos órgãos de fomento Capes, FAPERJ, CNPq e UENF.

E a todos que contribuíram de alguma forma, seja direta ou indiretamente, para esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células-tronco mesenquimais.....	1
1.2. Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais	5
1.3. Cultivo celular em ambiente bidimensional e tridimensional.....	7
1.4. Citocinas	10
1.4.1. Interleucinas	11
1.4.2. Interferons.....	12
1.4.3. Fatores estimuladores de colônias	12
1.4.4. Fatores de necrose tumoral	13
1.4.5. Quimiocinas	14
1.5. Fatores neurotróficos	16
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Modelo de estudo	21
3.2. Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea	21
3.3. Análise fenotípica das células-tronco mesenquimais	22
3.4. Obtenção da matriz de colágeno e cultivo celular	23
3.5. Extração do RNA e síntese do cDNA	23
3.6. Análise da expressão de genes através de PCR quantitativo em tempo real.....	24
3.7. Análise estatística	28

4. RESULTADOS	29
4.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais.....	29
4.2. Análise dos genes de referência.....	29
4.3. Análise da expressão gênica das citocinas e do receptor CXCR4	29
4.4. Análise da expressão gênica das neurotrofinas	32
4.5. Resumo dos resultados	33
5. DISCUSSÃO	35
5.1. Citocinas	35
5.2. Receptor CXCR4	37
5.3. Fatores neurotróficos e receptores de neurotrofinas	38
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

2D – Bidimensional;

3D – Tridimensional;

APC – Célula apresentadora de antígeno, do inglês *antigen-presenting cell*;

BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*;

cDNA - DNA complementar;

CSF - Fator estimulador de colônia, do inglês *colony stimulating factor*;

Ct – Ciclo limiar, do inglês *Cycle threshold*;

CTM - Célula-tronco mesenquimal;

CXCR4 - *Chemokine (C-X-C motif) receptor 4*;

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*;

G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*;

GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia, do inglês *glial cell-derived neurotrophic factor*;

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*;

IFN – Interferon;

IL- Interleucina;

M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*;

MEC - Matriz extracelular;

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*;

MNMO - Células mononucleares de medula óssea;

NGF - Fator de crescimento de nervo, do inglês *nerve growth factor*;

NGFR- Receptor do fator de crescimento de nervo, do inglês *nerve growth factor receptor*;

NK – *Natural killer*;

NO - Óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*;

NT – Neurotrofina;

NTRK – Do inglês *neurotrophic receptor tyrosine kinase*;

PBS - Salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate-buffered saline*;

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*;

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central;

SNP – Sistema nervoso periférico;

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*;

Trk - Tirosina quinase, do inglês *tyrosine kinase*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - A multipotência das células-tronco mesenquimais (CTMs).....	4
Figura 2 - Modelo geral da adesão célula-matriz extracelular (MEC) e sua regulação.....	9
Figura 3 - Mecanismos propostos para a migração de células-tronco mesenquimais (CTMs) para o local da lesão após a infusão	15
Figura 4 - Receptores NTRK e as vias de ativação intracelular decorrentes de sua ativação	18
Figura 5 - Análise da expressão dos marcadores de superfície nas CTMs por citometria de fluxo.	30
Figura 6 - Análise da expressão de genes de referência	31
Figura 7 - Análise comparativa da expressão de citocinas e do receptor CXCR4 nas condições 2D e 3D	31
Figura 8 - Padrão de expressão de IL-10 nas condições 2D e 3D em cada uma das três culturas	32
Figura 9 - Análise comparativa da expressão de neurotrofinas e seus receptores nas condições 2D e 3D	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de amplificação do <i>real time</i> PCR.....	25
Tabela 2 - Relação de genes de referência analisados.....	25
Tabela 3 - Relação dos genes analisados.....	27
Tabela 4 - Resumo dos resultados.....	34

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas, multipotentes e que podem se diferenciar em vários tipos celulares. Essas células são encontradas em pequena quantidade na medula óssea, mas são facilmente cultivadas *in vitro*. Estes motivos fazem com que o seu uso em terapia celular seja interessante. Seu cultivo é tradicionalmente bidimensional (2D), feito em placas de plástico. No cultivo em ambiente tridimensional (3D), uma matriz de colágeno, por exemplo, mimetiza o tecido vivo, propiciando a interação célula-célula e célula-matriz. Objetiva-se comparar a expressão gênica de citocinas e neurotrofinas entre CTMs cultivadas em ambiente 2D e 3D a fim de avaliar alterações do perfil imunomodulador dessas células. As CTMs foram obtidas de ratos Wistar e cultivadas até a terceira passagem. Parte destas células foram plaqueadas em placa de 24 poços e mantidas sob cultivo 2D, enquanto outra parte foi cultivada no modelo 3D. Após 24h, o RNA destas células foi extraído e o cDNA sintetizado, sendo analisado por *real time* PCR, verificando a expressão dos genes de citocinas e neurotrofinas de interesse. O método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para analisar os dados. Houve aumento da expressão dos genes de IL-1 β e do receptor de quimiocina CXCR4 na condição 3D, enquanto os genes de IL-1 α e IL-6 reduziram a expressão. A expressão de IL-10 aconteceu apenas na condição 3D e não houve expressão dos genes das interleucinas IL-2 e IL-4. Quanto as neurotrofinas, houve aumento dos genes de NGFR, NTRK1 e NTRK2 na condição 3D, redução da expressão de NGF- β e pouca variação nos genes de GDNF e NT-4. Não houve expressão do gene de BDNF. Nossos resultados sugerem que o cultivo em ambiente 3D não altera de forma significativa o potencial imunomodulador ou neuroprotetor das CTMs. Entretanto essas células aparentam estar mais responsivas ao sistema quimiotático e aos fatores neurotróficos.

Palavras-chaves: células-tronco mesenquimais, colágeno, expressão gênica, citocinas, neurotrofinas, terapia celular.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult and multipotent cells and can differentiate into various cell types. These cells are found in small quantities in the bone marrow, but are easily grown in vitro. These reasons make the use of MSCs in cell therapy interesting. Its cultivation is traditionally performed in two-dimensional (2D) in plastic plates. In three-dimensional (3D) cultivation, a collagen matrix, for example, mimics the live tissue, enabling interaction cell-cell and cell-matrix. The goal is to compare the gene expression of cytokines and neurotrophins between MSCs cultured in 2D and 3D environment in order to assess the changes in the immunomodulatory profile of these cells. MSCs were obtained from Wistar rats and grown to the third pass. Part of these cells were placed in 24-well plate and maintained under cultivation, while another part was grown in the 3D model. After 24 hours, the RNA of these cells was extracted for the synthesis of cDNA and analyzed by real time PCR, verifying the gene expression of cytokines and neurotrophins. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and T Test were used to analyze the data. There was an increase in gene expression of IL-1 β and chemokine receptor CXCR4 in 3D condition, while the genes of IL-1 α and IL-6 reduced expression. The expression of IL-10 happened only in 3D condition and there was no expression of genes of the interleukins IL-2 and IL-4. About the neurotrophins, there was an increase of NGFR, NTRK1 and NTRK2 genes in 3D condition, reduced NGF- β expression and little variation in the genes of GDNF and NT-4. There was no expression of BDNF gene. Our results suggest that the cultivation in 3D environment does not change significantly the potential immunomodulator or neuroprotective of MSCs. However, these cells appear to be more responsive to the chemotactic system and neurotrophic factors.

Keywords: cell therapy, collagen, cytokines, gene expression, mesenchymal stem cells, neurotrophins.

1. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, as células-tronco mesenquimais (CTMs) tem despertado grande interesse para a pesquisa científica. Sua capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares e a possibilidade de cultivo *in vitro* são características que propiciam o seu uso em terapias celulares (KAN *et al.*, 2005). Essas células-tronco são tradicionalmente cultivadas em um modelo bidimensional (2D), entretanto um modelo alternativo, tridimensional (3D), tem se mostrado uma alternativa interessante, uma vez que mimetiza com mais fidelidade a matriz extracelular (LIU *et al.*, 2007). Através das interações célula-célula e célula-matriz propiciadas pelo cultivo 3D, têm sido demonstrado que o perfil de expressão gênica das CTMs é alterado nessa forma de cultivo (QU *et al.*, 2011). Portanto as células cultivadas nesse modelo podem apresentar um perfil mais interessante para aplicações terapêuticas, quando comparadas com o modelo 2D. Neste trabalho nosso foco foi estudar as alterações na expressão gênica das citocinas, receptor CXCR4 e neurotrofinas e seus receptores entre as duas formas de cultivo.

1.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são células indiferenciadas que têm a capacidade de auto-renovação, se replicando incontáveis vezes durante o período de vida do organismo, e de se diferenciar em uma ampla variedade de tipos celulares, quando recebem os estímulos e as condições corretas (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009). Essas células são classificadas de acordo com a sua capacidade de diferenciação e seu local de origem, sendo então qualificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2009).

Todas as células que compõem os mamíferos são derivadas de uma única célula, chamada de zigoto, que possui a capacidade de gerar todas as células e tecidos que formam o embrião e que darão o apoio necessário para o seu desenvolvimento no útero. Devido a esta capacidade, esta célula é classificada como totipotente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). As células-

tronco embrionárias são derivadas de células encontradas na massa celular interna dos blastocistos. Elas tem a capacidade de originar os tipos celulares provenientes das três camadas germinativas embrionárias (mesoderma, endoderma e ectoderma), mas não podem dar origem às linhagens extraembrionárias, o que as classifica como pluripotentes (THOMSON *et al.*, 1998; LUNN *et al.*, 2011; MORGANI *et al.*, 2013). Seu uso em estudos clínicos tem sido impedido por diversos motivos, como a possibilidade de formar teratomas (um tipo de tumor composto por vários tecidos diferentes), o potencial de rejeição imunológica em transplantes alogênicos (entre indivíduos diferentes), a dificuldade de obtenção e as questões éticas envolvidas, visto que precisam ser extraídas de um embrião (KAN *et al.*, 2005).

Atualmente existem estudos sobre um novo tipo de célula-tronco pluripotente, a chamada iPSC (célula-tronco pluripotente induzida, do inglês *induced pluripotent stem cells*). Elas são geradas a partir de células adultas, como fibroblastos, que foram reprogramadas em laboratório através da adição de fatores de transcrição e passaram a ter características semelhantes às células-tronco embrionárias (YU e THOMSON, 2008; LUNN *et al.*, 2011).

Existem também as células-tronco adultas, que são derivadas de tecidos fetais ou adultos e podem se diferenciar em algumas linhagens celulares, determinadas por sua camada germinativa de origem. Por estas características, são classificadas como multipotentes (LUNN *et al.*, 2011). Estas células-tronco adultas têm a habilidade natural de se diferenciarem nos tecidos em que se encontram, porém já foram demonstradas provas de sua plasticidade, que as torna capazes de se diferenciarem em outros tecidos ao receber estímulo para tal (KAN *et al.*, 2005).

Um exemplo de células multipotentes são as células-tronco mesenquimais (CTMs), encontradas em diversos tecidos, como na medula óssea. Elas se diferenciam, naturalmente, em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; LUNN *et al.*, 2011). Portanto, devido às suas características, a terapia com essas células multipotentes se torna interessante, visto que são mais fáceis de se obter e poderiam ser usadas para substituir diversos tipos celulares, além de não levantarem debates éticos (KAN *et al.*, 2005).

Os primeiros a descrever as CTMs foram Friedenstein e seus colaboradores, na década de 1970. Eles descreveram colônias encontradas em culturas em monocamada de células da medula-óssea, baço, timo e linfonodos, que se assemelhavam a fibroblastos e eram aderentes ao plástico. Em culturas de medula-óssea, o grupo observou que, após descartar as células não-aderentes ao plástico e manter as células aderentes em cultura por dias, estas se tornaram mais uniformes e demonstraram a capacidade de se diferenciar em colônias que se assemelhavam a pequenos depósitos de cartilagem ou osso (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974; PROCKOP, 1997). As CTMs receberam este nome devido à sua habilidade de se diferenciarem em células que tem origem no mesênquima, que dá origem às células do tecido conjuntivo (como osteoblastos, condrócitos e adipócitos) (PROCKOP, 1997; LUNN *et al.*, 2011;). Entretanto já foi demonstrado que as CTMs podem se diferenciar em outros tipos celulares diferentes dos que ela se diferenciaria em seu local de origem, como neurônios e astrócitos (KOPEN *et al.*, 1999), células epiteliais tubulares renais (MORIGI *et al.*, 2004), cardiomiócitos, células musculares esqueléticas (XU *et al.*, 2004), hepatócitos (WANG *et al.*, 2004) e células epiteliais de pele (NAKAGAWA *et al.*, 2005), como ilustrado na Figura 1. Apesar de menos comum, elas também podem ser chamadas de células do estroma da medula, pois parecerem se originar das estruturas que dão suporte à medula óssea (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

As CTMs são comumente isoladas da medula óssea, entretanto, também têm se obtido sucesso em isolar estas células de outras fontes, como tecido adiposo, fluido amniótico, periósteo, tecidos fetais e polpa de dentes e ligamento periodontal (SHI *et al.*, 2005; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Inclusive, tem sido demonstrado que células com as características das CTMs existem em todos os órgãos e tecidos depois do nascimento (SHI *et al.*, 2005; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que estas células representam apenas 0,001 a 0,01% da população de células nucleadas da medula óssea, o que torna necessária a sua expansão *in vitro* (PITTENGER *et al.*, 1999).

Fenotipicamente, é de consenso geral que as CTMs não expressam os marcadores CD11b, CD14, CD18, CD31, CD34, CD40, CD45, CD56, CD80,

CD86 e Stro 1, mas expressam o CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 e ICAM-1. Entretanto, ainda não há nenhum marcador específico para as CTMs (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; PHINNEY e PROCKOP, 2007).

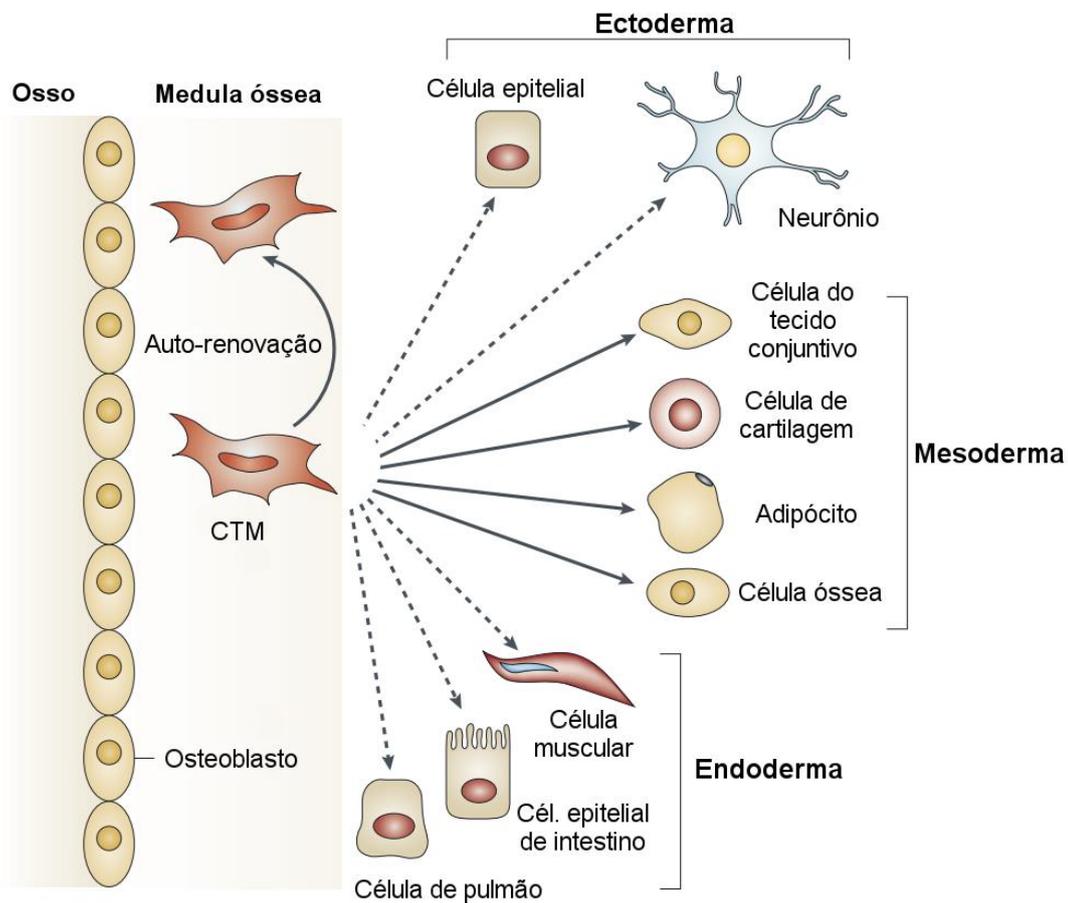


Figura 1 - A multipotência das células-tronco mesenquimais (CTMs). Esta imagem mostra CTM no interior da medula-óssea realizando a auto-renovação, e fora da medula-óssea se diferenciando (representada pelas setas sólidas) em tipos celulares de sua linhagem embrionária (mesoderma) ou se transdiferenciando em tipos celulares de outras linhagens, indicado pelas setas pontilhadas (Adaptado de UCCELLI *et al.*, 2008).

Também se sabe que as CTMs podem circular no sangue periférico e expressam receptores relacionados com a migração, o que indica a capacidade destas células serem convocadas a migrar pelo sangue periférico e participar da reparação do tecido lesionado (KAN *et al.*, 2005). Esta capacidade de migração foi demonstrada em um estudo com babuínos, onde os animais foram expostos a uma irradiação corporal total (uma técnica de radioterapia cuja sigla em inglês é TBI, de *total body irradiation*) letal e, em seguida, receberam a

injeção de CTMs marcadas com proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*). Um animal recebeu um transplante alogênico de células, enquanto os outros dois receberam transplantes autólogos. Entre 9 e 21 meses após a infusão de células, foi feita a necropsia destes animais e a presença do transgene de GFP nas amostras dos tecidos foi avaliada por *real-time* PCR. Nos três animais foi observada uma distribuição aleatória e semelhante destas células em tecidos não-hematopoiéticos, como tecidos gastrointestinais, pulmões, pele, timo, rins e fígado (DEVINE *et al.*, 2003).

1.2. Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais

As CTMs de medula óssea apresentam características que favorecem o seu uso em estudos experimentais de terapias celulares. Características estas que incluem: a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens, possibilidades de transplantes autólogos, facilidade de obtenção, capacidades imunomoduladoras e imunossupressoras, de migração do sangue para o tecido, de sintetizar moléculas bioativas que podem inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promover a sobrevivência de células lesadas (PITTENGER *et al.*, 1999; UCCELLI *et al.*, 2008). Como dito anteriormente, as CTMs podem se diferenciar em diversos tipos celulares quando expostas a diferentes fatores *in vitro*, o que possibilita algumas estratégias terapêuticas para estas células. Uma delas consiste na realização do enxerto destas células indiferenciadas diretamente no tecido, ou através de injeção sistêmica, para que ocorra a sua diferenciação através dos estímulos locais ou para que ao menos traga benefícios terapêuticos. Outra estratégia seria realizar a diferenciação das CTMs *in vitro* e então fazer o transplante para o tecido (KAN *et al.*, 2005).

As CTMs também são consideradas não-imunogênicas, o que possibilita o transplante alogênico sem imunossupressão. Por apresentarem MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe I, mesmo que em baixa quantidade, as CTMs podem ativar os linfócitos T, mas sem a presença de sinais secundários, os linfócitos T permanecem inativos. As CTMs não expressam MHC classe II, nem moléculas coestimulatórias, como CD40, CD80

e CD86 (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2015). Existem estudos que indicam propriedades imunossupressoras e imunomodulatórias das CTMs, alterando a ação das células dendríticas, a proliferação, diferenciação e quimiotaxia de linfócitos B humanos *in vitro*, linfócitos T e células NK (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2015). Por outro lado, as CTMs podem modular a resposta imune induzindo linfócitos T reguladores, que são importantes na manutenção da homeostase imunológica (ZHAO *et al.*, 2015).

O uso de CTMs já tem demonstrado eficácia em melhorar o resultado funcional após lesão cerebral traumática e por isquemia (LU *et al.*, 2001; MAHMOOD *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2010). Estudos que utilizam modelos animais de Acidente Vascular Encefálico (AVE), demonstram que o transplante de CTMs 24h após a indução da isquemia leva à melhora no desempenho de testes funcionais. Apesar dos mecanismos responsáveis por promover esta recuperação não estarem totalmente esclarecidos, acredita-se que o efeito benéfico destas células deve-se à quimioatração pela área lesada e a liberação de fatores tróficos e de crescimento, que amplificariam ou facilitariam os mecanismos de reparação tecidual que são normalmente ativados pela lesão isquêmica (CHOPP e LI, 2002).

Em humanos, estas células podem ser facilmente obtidas do aspirado de medula-óssea coletado da crista ilíaca superior da pelve, de forma semelhante à realizada para o transplante de medula-óssea. Em roedores, a medula óssea é geralmente obtida através da lavagem do interior do fêmur e da tíbia dos animais (KAN *et al.*, 2005). Contudo, como dito anteriormente, as CTMs representam apenas 0,001-0,01% do total de células nucleadas da medula óssea, o que torna preciso o plaqueamento e cultivo de culturas para que seja possível separá-las dos outros tipos de células da medula, a fim de se alcançar a quantidade necessária para que se possa obter efeito terapêutico significativo (PITTINGER *et al.*, 1999; KAN *et al.*, 2005).

Entretanto, as condições de cultivo podem alterar as características das CTMs e reduzir o seu potencial terapêutico. Depois de grande quantidade de divisões, estas células perdem gradualmente suas propriedades de proliferação e capacidade de migração. Um efeito semelhante também é observado nas células obtidas de doadores idosos. Isto tem sido relacionado com a taxa de

encurtamento dos telômeros (KAN *et al.*, 2005). Curiosamente isto não é observado em todas as culturas de CTMs: algumas mantiveram o comprimento dos telômeros após mais de 40 duplicações, depois de um encurtamento inicial. Isto pode indicar a existência de uma população mais primitiva de CTMs, que nem sempre é coletada na amostra de medula-óssea (BAXTER *et al.*, 2004).

A fim de padronizar a caracterização e obtenção das CTMs, um comitê da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs em 2006 três critérios para a caracterização de CTMs, sendo estes: 1) Aderência ao plástico; 2) expressão dos antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 em $\geq 95\%$ da população de células, mensurado por citometria de fluxo, e expressar $\leq 2\%$ dos antígenos CD45, CD34, Cd14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II; 3) terem a capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, sob condições padronizadas (DOMINICI *et al.*, 2006).

1.3. Cultivo celular em ambiente bidimensional e tridimensional

Como dito anteriormente, as CTMs representam pequena parcela do total de células da medula óssea (0,001-0,01%), o que torna necessária a sua expansão *in vitro* para que se obtenha quantidade maior de células (PITTENGER *et al.*, 1999). Este cultivo é comumente realizado utilizando o modelo bidimensional (2D), onde toda a amostra de medula óssea obtida é fracionada por densidade e plaqueada em garrafas ou placas plásticas, com meio de cultura constituído basicamente por DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e soro fetal bovino (SFB). Após algumas horas ou dias, a cultura é lavada, para que as células não-aderentes sejam descartadas e apenas as aderentes (como as CTM's) permaneçam na cultura. Durante a cultura estas células adquirem morfologia semelhante à de fibroblastos. Quando atingem confluência, ou seja, ocupam quase toda a superfície do recipiente plástico, estas células são soltas e replaqueadas em duas novas garrafas plásticas, ou placas de Petri, a fim de que continuem sua expansão. Este processo ainda pode ser repetido algumas vezes, para que se atinja um grande número de células (KAN *et al.*, 2005). Apesar dos diversos estudos que

utilizam este modelo 2D de cultivo para as CTMs, ele falha em mimetizar a condição encontrada *in vivo*, onde as células estão envolvidas pela matriz extracelular (MEC). Condição esta que o modelo de cultivo tridimensional (3D) consegue simular com mais eficiência (LIU *et al.*, 2007).

No organismo vivo, as células estão envolvidas pela MEC, que é uma rede complexa de moléculas de colágeno, lamininas, proteoglicanos, fibronectinas, entre outras. A interação entre o ambiente extracelular e a superfície celular se dá por receptores, que transmitem informações que influenciam no comportamento da célula, causando impacto na expressão gênica e nas cascatas de sinalização pós-transcricionais. A adesão da célula à MEC leva à indução de estruturas na superfície celular que fortalecem a adesão e medeiam as interações entre a célula e o ambiente extracelular. Isto é importante para a migração e diferenciação celular, assim como na organização tecidual. Os sinais resultantes desta adesão atuam juntamente com outras vias biológicas, como as de proliferação celular, sobrevivência e cicatrização de feridas (HERVY *et al.*, 2006; BERRIER e YAMADA, 2007).

Com a adesão da célula à MEC, são enviadas informações através de receptores de integrina que regulam a sinalização intracelular de fora para dentro, o que é importante para a difusão e migração celular. O inverso também pode ocorrer, através de sinalizações de dentro para fora, que levam à mudanças na conformação das integrinas (BERRIER e YAMADA, 2007). Através desta sinalização, as integrinas podem desencadear diversas vias em cascata no interior da célula, levando à diferenciação e migração celular, controlando a organização do citoesqueleto, regulação gênica e diversos outros processos (Fig. 2) (HERVY *et al.*, 2006 BERRIER e YAMADA, 2007).

Fibroblastos cultivados em ambiente 2D se apresentam espalhados, achatados e com polaridade celular, devido ao contato de sua superfície ventral à matriz plástica rígida, o que leva à formação de adesão focal na superfície ventral destas células (CUKIERMAN *et al.*, 2001). Entretanto, quando colocados novamente em um ambiente 3D, os fibroblastos tentem a apresentar o seu fenótipo característico: fusiforme, alongado e não-polarizado. Estas diferenças morfológicas sugerem que a configuração física da matriz fornece sinais espaciais que determinam a aparência destas células. Se este mesmo ambiente 3D, com os mesmos componentes, for achatado na forma de uma

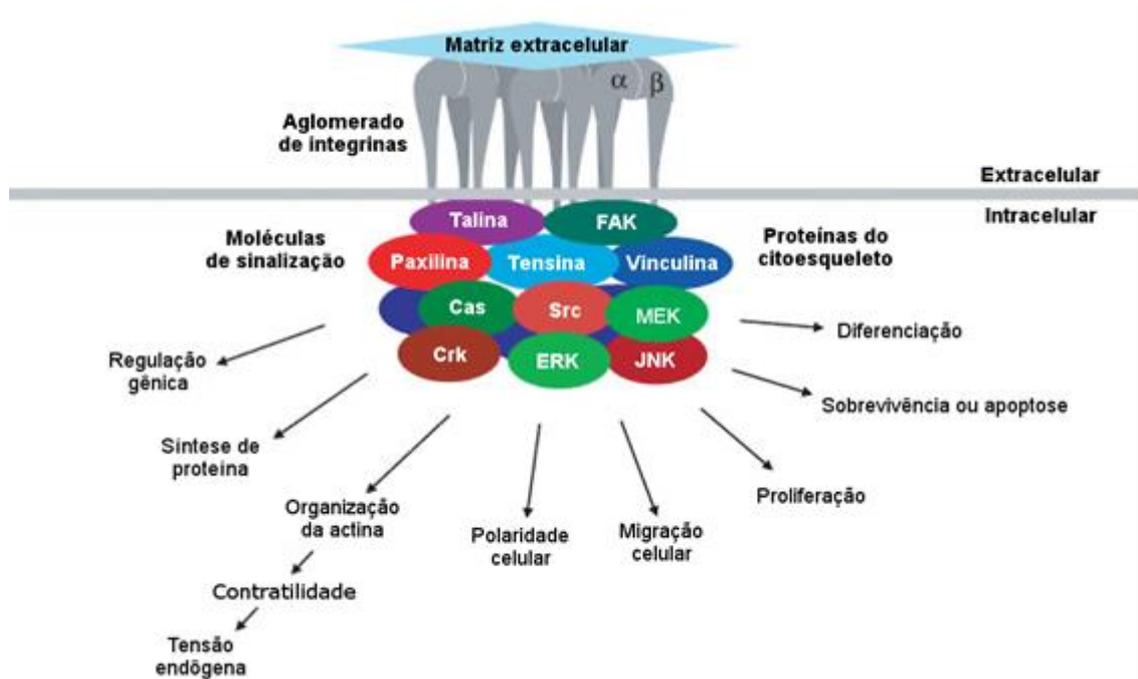


Figura 2 - Modelo geral da adesão célula-matriz extracelular (MEC) e sua regulação. A região de adesão da célula com a MEC contém aglomerados de integrinas que recrutam proteínas citoplasmáticas (como Talina, Paxilina, Tensina, FAK, Vinculina, Cas, Src, MEK, Crk, ERK e JNK), que por sua vez controlam diversos processos celulares, funções e fenótipos (Adaptado de BERRIER e YAMADA, 2007).

superfície 2D, e as células cultivadas em sua superfície, elas voltam a apresentar o fenótipo achatado, como se cultivadas em ambiente 2D (CUKIERMAN *et al.*, 2001; GIANNONE e SHEETZ, 2006).

O uso das CTMs imersas em matriz 3D de colágeno já vem sendo feito em estudos com modelos de lesão do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo estudos do nosso grupo, sendo demonstrado aumento da sua eficácia terapêutica nessa condição de cultivo e administração em relação ao cultivo convencional em 2D (QU *et al.*, 2011; DE FREITAS *et al.*, 2012, MAHMOOD *et al.*, 2014; DE FREITAS *et al.*, 2015). Portanto, torna-se importante investigar o efeito do cultivo em 3D sobre o fenótipo em geral das CTMs, em especial sobre as características que a tornam terapeuticamente eficazes. Neste sentido, estudos de expressão gênica diferencial são importantes para este fim. Em um estudo desta natureza, até onde sabemos o único na literatura, foi comparado o nível de expressão de diversos genes relacionados com angiogênese, neurogênese e transdução de sinal, através da técnica de *microarrays*, entre CTMs cultivadas em 2D e 3D (matriz de colágeno) (QU *et al.*, 2011). Diversos destes genes apresentam significativo aumento na sua expressão no ambiente

3D, sugerindo que este tipo de cultivo amplifica a expressão de genes que proporcionam o efeito terapêutico das CTMs (QU *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de avaliar inúmeros genes, este estudo não avaliou genes relacionados com o potencial imunomodulador, migratório e neuroprotetor destas células. No presente trabalho nosso foco foi estudar a expressão diferencial entre estes dois tipos de cultivos de genes relacionados com estes três importantes aspectos terapêuticos das CTMs.

1.4. Citocinas

De forma geral, as citocinas podem ser definidas como pequenas proteínas produzidas por células que podem afetar o comportamento de outras células (MURPHY, 2014). São os mediadores mais importantes da comunicação entre as células do sistema imunológico. As citocinas não são estocadas como moléculas pré-formadas e atuam principalmente promovendo comunicação entre células vizinhas ou sobre si mesmas (sinalização parácrina ou autócrina, respectivamente), características estas que as diferem dos hormônios (LIN *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2012;).

A mesma citocina pode ser secretada por tipos celulares diferentes, assim como pode atuar sobre diversos tipos de células. Além disto, diferentes citocinas podem gerar a mesma ação. Se ligando aos seus receptores específicos, essas moléculas ativam mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica, influenciando na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, além de moderar a síntese e ação de outras citocinas (LINS *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

De acordo com a sua capacidade de aumentar ou reduzir a resposta inflamatória, as citocinas são classificadas como pró- ou anti-inflamatórias, respectivamente, o que pode variar de acordo com o microambiente em que estão atuando. Elas são importantes na condução da resposta inflamatória às regiões onde há lesão ou infecção. Entretanto, se estas forem graves, pode ocorrer uma resposta exagerada de citocinas pró-inflamatórias, o que pode levar ao agravamento da lesão. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias

podem reduzir estes efeitos exacerbados e indesejáveis (RAEBURN, *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; MURPHY, 2014).

A fim de classificação, as citocinas foram organizadas em alguns grupos: interleucinas (IL's), fatores de necrose tumoral, quimiocinas, interferons (IFN's) e fatores de crescimento (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.4.1. Interleucinas

O grupo das interleucinas é composto por diversas moléculas diferentes, que podem ter ação pró-inflamatórias (como IL-1, IL-2 e IL6) ou anti-inflamatórias (como IL-4 e IL-10). Sobre estas, podemos destacar que (VARELLA e FORTE, 2001; ZHANG e AN, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011):

- A IL-1 pode ser produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células endoteliais, fibroblastos, miócitos e células de Langerhans, caso estejam sofrendo algum tipo de injúria. Esta interleucina pode ser de dois tipos diferentes, chamados de IL-1 α e IL-1 β . Ambas têm como atividade principal a co-estimulação de linfócitos T e de células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*), assim como promover febre, inflamação, resposta de fase aguda e hematopoiese;
- A IL-2 é comumente produzida por linfócitos Th1 e células *natural killer* (NK), tendo como principal atividade promover a proliferação de linfócito B e linfócitos T ativados e pela ação de células NK;
- A IL-6 é secretada por macrófagos, monócitos, linfócitos Th2 ativados, APCs e outras células somáticas. Essa interleucina causa febre, atua na resposta da fase aguda, na proliferação de linfócitos B, na ativação de neutrófilos, astrócitos e microglia, maturação de macrófagos, diferenciação de linfócitos T citotóxicos, na trombopoiese (produção de plaquetas) e em sinergismo com a IL-1 e o TNF nos linfócitos T;
- A IL-4 é sintetizada principalmente por linfócitos T ativados, promove a proliferação de linfócitos B e atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos da IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), IL-6 e IL-8;

- A IL-10 tem como principais fontes os linfócitos Th2, T CD8+, linfócitos B e macrófagos. Ela inibe as citocinas pró-inflamatórias, promove a produção de anticorpos, estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias e a proliferação de linfócitos B.

1.4.2. Interferons

Os IFNs são um subgrupo de citocinas que pode interferir em infecções virais e tem funções imunomoduladoras importantes. Eles são divididos em dois grupos: IFN tipo I, compostos pelo IFN- α e o IFN- β , que têm ação antiviral; e tipo II, chamado de IFN- γ , que atua na ativação de macrófagos e outros tipos celulares (ABBAS *et al.*, 2012).

IFN- γ é produzido principalmente em células NK e linfócitos Th1 ativados. O IFN- γ induz a expressão de MHC classe I em todas as células somáticas e MHC classe II nas APCs e células somáticas, além de ativar macrófagos, neutrófilos e células NK, promover a imunidade mediada por células e efeitos antivirais (ZHANG e AN, 2007). O IFN- γ também inibe a proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e induz a síntese de TNF α por monócitos e macrófagos. Portanto, IFN- γ tem ação pró-inflamatória (VARELLA e FORTE, 2001).

1.4.3. Fatores estimuladores de colônias

Os fatores estimuladores de colônias (CSFs, do inglês *colony stimulating factors*) são importantes para promover o direcionamento da divisão e diferenciação das células progenitoras da medula óssea em eritrócitos, granulócitos, monócitos e linfócitos. Dentre estas citocinas, podemos destacar M-CSF, G-CSF e GM-CSF (ABBAS *et al.*, 2012; MALE *et al.*, 2014).

O fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) é sintetizado por monócitos, células T ativadas, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, apesar destes últimos o produzirem em menor quantidade. M-CSF induz as células precursoras dos monócitos a se proliferarem, aumentando a produção

de monócitos na medula óssea e de macrófagos nos tecidos (VARELLA e FORTE, 2001; ABBAS *et al.*, 2012; MALE *et al.*, 2014).

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é produzido principalmente por macrófagos, mas também por células T ativadas, monócitos, células endoteliais e fibroblastos. G-CSF estimula a divisão e diferenciação das células progenitoras da medula óssea em polimorfonucleares, como neutrófilos, para que se direcionem para a lesão e substituam os que foram perdidos nas reações inflamatórias (VARELLA e FORTE, 2001; ABBAS *et al.*, 2012).

O fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF ou CSF-2) é sintetizado em maior escala por linfócitos T e macrófagos, apesar de fibroblastos e células endoteliais também o fazerem em menor quantidade. GM-CSF age tanto sob as células precursoras de monócitos quanto sob as de granulócitos, incitando a proliferação e diferenciação destas células (VARELLA e FORTE, 2001; FAUCI e LANGFORD, 2014). Além disto, o GM-CSF também promove a ativação de macrófagos e a diferenciação das células de Langerhans em células dendríticas maduras (ABBAS *et al.*, 2012).

1.4.4. Fatores de necrose tumoral

Os TNFs tem papel importante na mediação das respostas inflamatórias agudas a bactérias e outros microrganismos e nas reações citotóxicas, além de exercer outras funções. Ele também é chamado de TNF- α , para que seja diferenciado da linfotoxina, chamada de TNF- β (ABBAS *et al.*, 2012; MALE *et al.*, 2014).

O TNF- α é produzido por macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células NK e neurônios sensoriais. Diversas substâncias produzidas por bactérias podem estimular a produção de TNF- α , que atua principalmente na morte celular, inflamação e dor, portanto tem ação pró-inflamatória (ABBAS *et al.*, 2012; ZHANG e AN, 2007). O TNF- β , por sua vez, é encontrado principalmente nos linfócitos T citotóxicos e Th1, tendo como ação primária a fagocitose, produção de NO (óxido nítrico) e morte celular (ZHANG e AN, 2007).

1.4.5. Quimiocinas

As quimiocinas são uma família de citocinas que podem ser produzidas e liberadas por diversos tipos celulares que não fazem parte do sistema imune, mas neste sistema atraem células efetoras da imunidade inata e adaptativa do sangue para o local onde elas são liberadas (MURPHY, 2014). As quimiocinas estimulam a movimentação e regulam a migração dos leucócitos do sangue para o local da infecção ou lesão tecidual, principalmente pela ativação de receptores de leucócitos que estão acoplados à proteína-G. Esta migração recebe o nome de quimiotaxia e se dá por um gradiente de concentração química dessas moléculas, como ilustrado na Figura 3 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; ABBAS *et al.*, 2012).

A classificação das quimiocinas se dá em quatro grupos, cujas diferenças, em resumo, se baseiam na posição dos resíduos de cisteínas. O maior dos grupos é o CC, que tem os aminoácidos cisteínas adjacentes e estimulam a migração de monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (GUERREIRO *et al.*, 2011). O grupo CXC tem as cisteínas separadas por um aminoácido e promovem principalmente a migração de neutrófilos (MURPHY, 2014). O terceiro grupo de quimiocinas é o CX₃C, onde as cisteínas estão separadas por três aminoácidos, e tem efeito quimiotático sobre células mononucleadas do sangue periférico (GUERREIRO *et al.*, 2011). E o último é o grupo C, que apresenta duas cisteínas e tem ação sobre as células efetoras (como células NK e linfócitos T CD8+) e linfócitos T-auxiliares (GUERREIRO *et al.*, 2011).

Cada grupo de quimiocinas se liga a receptores diferentes, então destacaremos o grupo CXC, do qual avaliaremos um receptor (CXCR4). As quimiocinas CXC se ligam do receptor CXCR1 ao CXCR6 (receptores tipos 1 a 6 da quimiocina CXC), atuando sobretudo em neutrófilos (GUERREIRO *et al.*, 2011). Essas quimiocinas são classificadas pela presença ou ausência da sequência de aminoácidos ELR. As que possuem esta sequência têm a capacidade de atrair e ativar neutrófilos, estimular a quimiotaxia e a angiogênese (produção de novos vasos sanguíneos). Em paralelo, as CXC não-ELR são angiostáticas (inibe a angiogênese) e inibem o crescimento tumoral (GUERREIRO *et al.*, 2011).

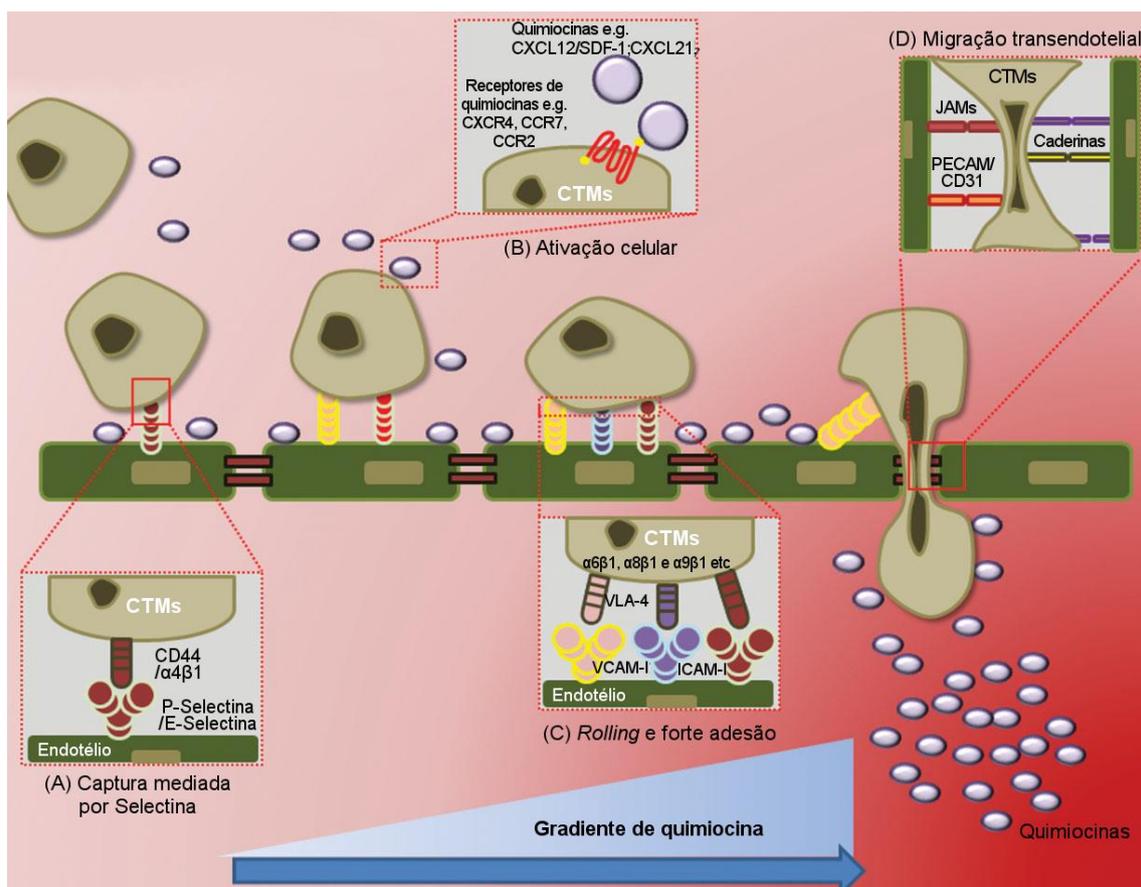


Figura 3 - Mecanismos propostos para a migração de células-tronco mesenquimais (CTMs) para o local da lesão após a infusão. Abreviaturas: ICAM, *intercellular adhesion molecule*; JAMs, *junctional adhesion molecules*; PECAM, *platelet-endothelial cell-adhesion molecule*; PGE, *prostaglandin E2*; VCAM, *vascular cell-adhesion molecule*; VLA, *very late antigen* (Adaptado de SALEM e THIEMERMANN, 2010).

O CXCR4 é um receptor de CXC, e é expresso em diversos tipos celulares (MURPHY, 2014). O CXCR4 atua na trombocitopoiese e no desenvolvimento embrionário, mas tem papel importante na quimiotaxia. Ele é o principal receptor da quimiocina CXCL12, que atua em células da medula óssea, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos, entre outros tipos celulares (MURPHY, 2014). O CXCR4 é expresso por leucócitos e seus precursores, assim como células dendríticas (como células de Langerhans), células endoteliais, astrócitos e neurônios do SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP) (MURPHY, 2014). Em neurônios e astrócitos, a ação da CXC sobre CXCR4, interfere na liberação de glutamato, afetando a excitabilidade e a apoptose neuronal (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; GUERREIRO *et al.*, 2011).

O sistema quimiotático CXCL12/CXCR4 vem sendo descrito como o principal mecanismo molecular de quimioatração (tropismo) das CTMs para

tecidos lesionados, como, por exemplo, no caso das lesões do SNC (SHYU *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008).

1.5. Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos são proteínas produzidas principalmente por células neurais e agem principalmente sobre os neurônios, promovendo sua diferenciação, sobrevivência e funcionalidade (PEZET e MCMAHON, 2006). Elas são constituídas por duas principais famílias de proteínas: as neurotrofinas e o fator neurotrófico derivado de glia (GDNF).

As neurotrofinas são proteínas diméricas produzidas por células neurais e que agem sobre os neurônios (PEZET e MCMAHON, 2006). Este grupo é composto pelo fator de crescimento de nervo (conhecido como NGF), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e neurotrofinas NT-3 e NT-4 (também conhecida como NT-5 ou NT4/5), sendo todas sintetizadas da mesma maneira: existe um precursor que é clivado para uma forma madura (PEZET e MCMAHON, 2006). Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as neurotrofinas dão apoio à sobrevivência de subpopulações neuronais que expressam os receptores apropriados. Existem diferenças na expressão destes receptores no SNC e no SNP, o que resulta em ações neuroprotetoras diferentes para cada neurotrofina (PEZET e MCMAHON, 2006). Cada neurotrofina se liga com alta afinidade a um dos receptores transmembrana da família trk (tirosina-quinase): NGF se liga ao NTRK1 (sigla para *neurotrophic receptor tyrosine kinase 1*), também chamado de trkA; BDNF e NT-4 ao NTRK2 (ou trkB); e NT-3 se liga ao NTRK3 (ou trkC) e com baixa afinidade ao NTRK1 (PEZET e MCMAHON, 2006). Estas ligações ativam vias de grande importância para a manutenção do sistema nervoso (Fig. 4) (PEZET e MCMAHON, 2006). Estes receptores se associam ao receptor transmembrana p75, também chamado de NGFR (receptor de fator de crescimento de nervo, ou receptor de neurotrofinas de baixa afinidade), que pode se ligar com baixa afinidade ao NGF, BDNF, NT-3 e NT-4, e, portanto, mediar a sobrevivência da célula, assim como a morte de células neuronais, além de desempenhar outros papéis em outros órgãos, como o fígado (UNIPROT, 2016a).

NGF atua na manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso sensorial e simpático. A cascata de sinalização celular ativada através da ligação com o NTRK1, promove regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência nos neurônios que expressam esse receptor, levando à reparação e recuperação funcional de nervos lesionados (SEBBEN *et al.*, 2011; UNIPROT, 2016b).

O BDNF promove a sobrevivência e diferenciação de populações neuronais selecionadas do SNC e SNP durante o desenvolvimento. Como os neurônios motores expressam receptores NTRK2, BDNF tem grande importância no suporte à sobrevivência deles. Esta neurotrofina também atua no crescimento axonal, na modulação da morfologia e no crescimento dendrítico, sendo o principal regulador da transmissão sináptica e da plasticidade nas sinapses adultas em diversas regiões do SNC (SEBBEN *et al.*, 2011; UNIPROT, 2016c). Já foi demonstrado que o BDNF também tem ação importante na indução da resposta da célula nervosa injuriada, por apresentar a capacidade de estimular a extensão dos prolongamentos desses neurônios. Além deste estímulo, o BDNF é importante na regeneração e remielinização do nervo periférico após uma lesão. Essa neurotrofina ainda tem a capacidade de estimular a mitose e diferenciação de células-tronco em células neurais *in vitro* (SEBBEN *et al.*, 2011).

NT-3 é encontrada especialmente em neurônios no SNC, porém também é expressa em músculos. Ela incita o crescimento e a diferenciação de novos neurônios e sinapses, além de atuar sobre neurônios já existentes, promovendo a sua diferenciação, e ser importante para o desenvolvimento de vários tipos de mecanorreceptores (PEZET e MCMAHON, 2006; SEBBEN *et al.*, 2011).

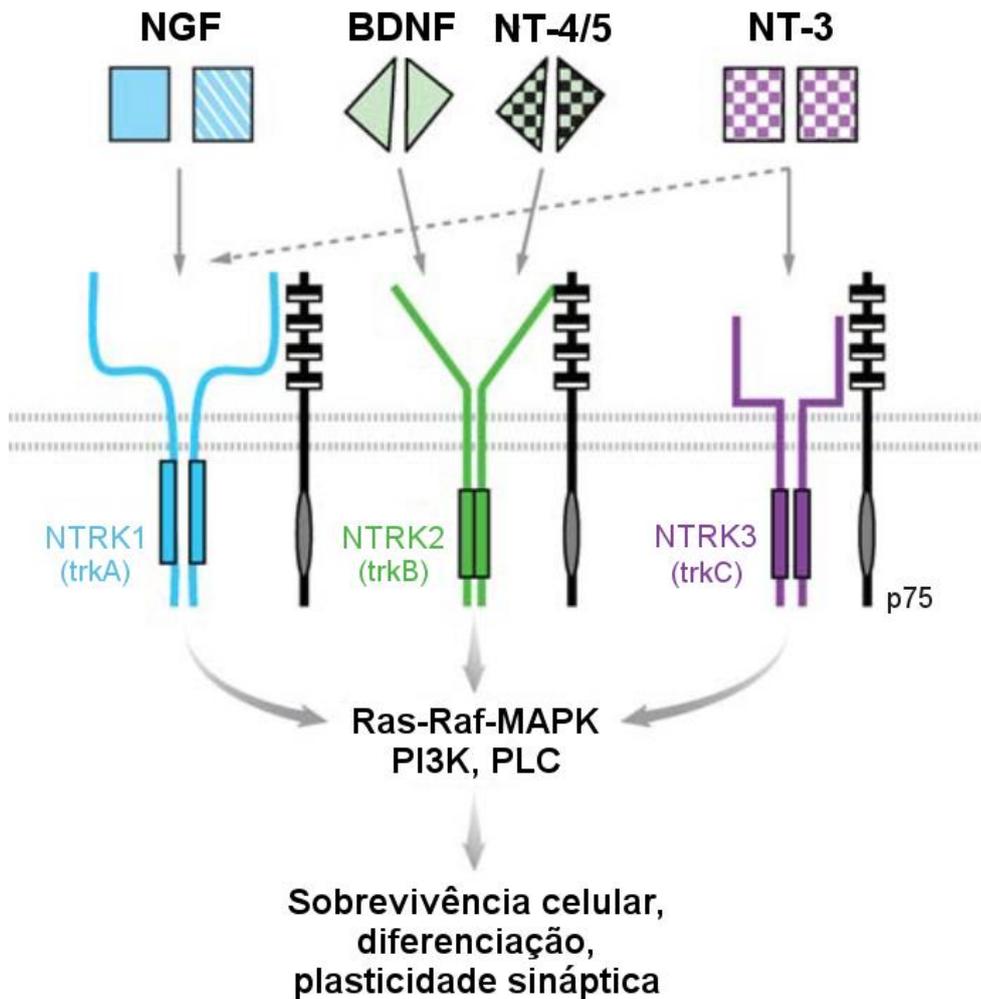


Figura 4 - Receptores NTRK e as vias de ativação intracelular decorrentes de sua ativação. Os receptores NTRK1, NTRK2 e NTRK3 estão presentes na membrana celular e se ligam especificamente às neurotrofinas. O NGF se liga ao receptor NTRK1, enquanto o BDNF e o NT-4/5 se ligam ao NTRK2. O NT-3 pode se ligar ao NTRK3 e ao NTRK1, mas com baixa afinidade (Adaptado de PEZET e MCMAHON, 2006).

NT-4 é sintetizada por neurônios dos gânglios simpáticos para-vertebral e pré-vertebral, por neurônios dos gânglios da raiz dorsal e por uma população de neurônios da espinha dorsal e do corno ventral. Têm efeitos neurotróficos sob algumas subpopulações de neurônios e leva à sobrevivência de neurônios motores e sensoriais. Estudos recentes tem utilizado a NT-4 para promover a regeneração de nervos periféricos injuriados e têm obtido resultados positivos (PEZET e MCMAHON, 2006; SEBBEN *et al.*, 2011).

GDNF foi inicialmente purificado a partir de meio condicionado de glioma de rato e descrito como um fator de sobrevivência de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, tendo importante relação com a Doença de

Parkinson (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002). Posteriormente, seu papel no sistema nervoso foi revelado como bem mais amplo, tendo, inclusive, fundamental importância em outros órgãos e tecidos, além daqueles pertencentes ao sistema nervoso (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002). Neste sistema, ele tem sido demonstrado, por exemplo, como um fator neurotrófico protetor em neurônios motores, muito importante na formação destes e de neurônios sensitivos no processo de regeneração. Além disso, ele pode estimular o crescimento e alongamento dos axônios em cultivos de células neuronais (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002; PEZET e MCMAHON, 2006; KRAYCHETE *et al.*, 2008; KANDRATAVICIUS *et al.*, 2010). Por estas propriedades, o GDNF, assim como todos os outros fatores neurotróficos, vem sendo sistematicamente estudado como importante agente terapêutico em modelos de doenças e de lesões do sistema nervoso (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002).

2. OBJETIVO

Com o intuito de verificar o possível efeito do cultivo em matriz de colágeno (3D) no perfil imunomodulador, quimiotático e neuroprotetor das CTMs, o objetivo desse trabalho foi comparar a expressão gênica de citocinas, neurotrofinas e seus receptores e do receptor da quimiocina CXCL12, CXCR4, entre CTMs cultivadas apenas em ambiente 2D e em 3D.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo de estudo

Neste estudo foram utilizados como modelo experimental ratos Wistar machos, com 2 a 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UENF. Os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Instituição.

3.2. Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea

Três animais saudáveis foram submetidos à eutanásia na câmara de CO₂. De cada animal, foram extraídos o fêmur e a tíbia de cada pata, em um total de 4 ossos por animal. E cada animal originou uma cultura independente, sendo utilizadas no presente trabalho um total de três culturas. As epífises dos ossos foram cortadas, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular com uma seringa contendo DMEM/F12 sem soro fetal bovino. O conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis, dissociados mecanicamente e centrifugado por 5 minutos a 400 x g. Recolheu-se o precipitado e, novamente, este foi suspenso em meio de cultura e submetido à centrifugação em Histopaque 1083 a 400 x g por 30 min, para a separação das células mononucleares da medula óssea (MNMOS). Após a centrifugação, as MNMOS foram retiradas da fase entre o Histopaque e meio de cultura, sendo então colocadas em um tubo com PBS para a realização da lavagem, feitas por três séries de centrifugação por 5 min a 400 x g seguida de ressuspensão em novo PBS. As MNMOS foram então plaqueadas em frascos estéreis de 75 cm² e mantidas com meio de cultura DMEM/F12, suplementado com 10% de SFB, sendo também adicionados os antibióticos penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/mL) e neomicina (50 µg/mL) e o antifúngico anfotericina B (fungizona; 25 µg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas com a substituição do meio em intervalos de 2-3 dias de cultivo. Quando as

células atingiram a confluência, elas foram soltas utilizando 4 mL de solução contendo 0,25% de tripsina e de EDTA (Gibco®) e replaqueadas em novas garrafas. Foi sempre colocado metade do conteúdo de células em cada nova garrafa (portanto, uma garrafa gerou sempre duas novas a cada passagem). Este processo foi repetido três vezes, para que fosse atingido um alto nível de purificação das CTMs. São necessárias, aproximadamente, 5 semanas para que as células atinjam este nível de purificação, desde que foram extraídas da medula óssea do animal. Para os devidos procedimentos descritos abaixo, as CTMs foram soltas da placa por tripsinização, lavadas e suspensas em PBS e contadas através do método da coloração com solução aquosa de 4% de azul de tripano em microscópio invertido com iluminação de contraste de fase, utilizando câmara de *Neubauer*.

3.3. Análise fenotípica das células-tronco mesenquimais

Para a marcação com os anticorpos, as células foram pré-incubadas com PBS contendo 2% de SFB e 0,1% de azida. Posteriormente as células foram incubadas na mesma solução adicionada de cada anticorpo, sendo cada anticorpo usado separadamente, em uma proporção de $2,5 \times 10^5$ células para cada anticorpo. As CTMs permaneceram incubadas por 20 minutos a 4°C com os anticorpos, sendo posteriormente centrifugadas e ressuspendidas novamente em solução de PBS contendo 2% de SFB e 0,1% de azida por três vezes para lavagem. Em seguida foram encaminhadas para a análise no citômetro de fluxo (modelo *FACSCalibur*, *BD Biosciences*).

A caracterização imunofenotípica das CTMs foi feita empregando anticorpos conjugados com fluoróforos contra os seguintes marcadores:

- Marcadores positivos: anti-CD29/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/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*).

3.4. Obtenção da matriz de colágeno e cultivo celular

O experimento foi realizado em placas de 24 poços. Cada uma das três culturas originou os dois grupos experimentais: condição 2D (cultivadas aderidas ao fundo do poço) e condição 3D (cultivadas inseridas em uma matriz de colágeno tipo I). Para o cultivo em condição 2D, as CTMs foram mantidas em 2,5 mL de DMEM/F12, suplementado com 10% de SFB e antibióticos e fungicida. No cultivo em ambiente 3D, 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*), totalizando 200 µl por poço. Após colocadas nos poços, as células foram incubadas por 1 h em estufa a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, para gelificação do colágeno. Em seguida, foi adicionado às amostras 2,5 mL de DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e mais antibióticos e fungicida. Foram colocadas 1x10⁶ células por poço para ambas condições, e o cultivo ocorreu por 24h em estufa a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂.

3.5. Extração do RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA total das células foi feita utilizando-se o kit comercial *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (*Zymo Research*), seguindo protocolo do fabricante. Porém, antes de se dar início ao protocolo do kit, o sobrenadante de todos os poços foi retirado e descartado, e o material dos poços com cultivo 3D (com

colágeno) foi congelado com nitrogênio líquido e macerado. Com o RNA obtido, foi realizada a síntese de cDNA através de RT-PCR (*reverse transcription PCR*), utilizando-se o kit *Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific)*, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Em seguida, o cDNA resultante foi quantificado em fotoespectômetro (Picodrop) e diluído para a concentração de 50ng/ µl.

3.6. Análise da expressão de genes através de PCR quantitativo em tempo real

Foram utilizados primers adquiridos da empresa *GenOne Biotechnologies* (Brasil), todos com 90 e 110% de eficiência, de acordo com o fabricante. As sequências não são fornecidas pelo fabricante, mas a empresa atesta sua especificidade e confiabilidade.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando-se o kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)*, seguindo o protocolo do fabricante. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionadas 50ng da amostra de cDNA, diluídas em 1 µl de água ultrapura, 6,3 µl de SYBR Green/ROX, 1 µl de primer (à concentração de 1 µM) e 3,7 µl de água ultrapura, totalizando 12 µl por poço. Então foram submetidas às condições de ciclagem descritas na Tabela 1. Cada condição foi sempre feita em triplicata (três poços em uma mesma placa).

Foi utilizado o equipamento *StepOnePlus™ (Applied Biosystems)* para realizar as leituras de fluorescência, que foram analisadas em seguida pelo programa de análise *StepOne v2.1 (Applied Biosystems)*. O valor medido pelo equipamento para cada poço foi o Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar), que é definido como o ciclo do PCR em que o sinal de fluorescência do marcador atravessa o limiar estabelecido arbitrariamente (Schmittgen e Livak, 2008), sendo este ajustado no programa de análise. Os valores de Ct de cada poço foram exportados para planilha do Excel, onde foram montadas planilhas de análise pelos métodos de quantificação descritos a seguir.

TABELA 1 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO REAL TIME PCR

ETAPA	Temperatura	Duração	Número de ciclos
DESNATURAÇÃO INICIAL	95°C	10 min	-
DESNATURAÇÃO	95°C	10 seg	45
ANELAMENTO/EXTENSÃO	58°C	45 seg	

Análise dos genes de referência

Para seleção do gene de referência a ser utilizado como controle endógeno para a análise da expressão dos genes de interesse, foi feita análise da expressão de seis genes normalmente utilizados como genes de referência para verificação de qual(is) é(são) o(s) invariante(s) nas duas condições experimentais. Os genes utilizados na análise estão relacionados na Tabela 2.

TABELA 2 - RELAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA ANALISADOS.

SIGLA	Nome
B2M	Beta-2 microglobulin
ACTB	Actin, beta (Beta-actin)
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
GUSB	Glucuronidase beta
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A

Para estas análises foi utilizado o método do $2^{-\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Fold change (nível de alteração)} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ da condição experimental} - Ct \text{ da condição controle})}$$

onde a condição experimental é a 3D e a condição controle é a 2D. O cálculo foi feito para cada gene de referência dentro de cada cultura. Os genes escolhidos como genes de referência para a análise da expressão dos genes de interesse foram o PGK1 e o GUSB (vide em resultados).

Análise da expressão dos genes de interesse

Para a análise da expressão diferencial dos genes de interesse entre as condições 3D e 2D foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Fold change (nível de alteração)} = 2^{-\Delta Ct \text{ (condição experimental)}} / 2^{-\Delta Ct \text{ (condição controle)}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

onde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (condição experimental)} - \Delta Ct \text{ (condição controle)} = (Ct \text{ do gene de interesse na condição experimental} - Ct \text{ do gene de referência na condição experimental}) - (Ct \text{ do gene de interesse na condição controle} - Ct \text{ do gene de referência na condição controle}).$$

A condição experimental é a 3D e a condição controle é a 2D. O cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi feito pareando as condições 3D e 2D dentro de cada cultura, tendo cada uma o seu respectivo valor de *fold change* para cada gene de interesse. Esta análise só foi realizada para os genes cuja expressão foi detectada em todas as culturas e condições. Expressão detectada apenas em uma das condições, mas nas três culturas, foi considerada expressão exclusiva daquela condição. Os demais casos foram considerados como resultado inconclusivo. Os genes de interesse analisados estão relacionados na Tabela 3.

TABELA 3 - RELAÇÃO DOS GENES ANALISADOS.

SIGLA	Nome
IL1A	Interleukin 1 alpha
IL1B	Interleukin 1 beta
IL2	Interleukin 2
IL4	Interleukin 4
IL6	Interleukin 6
IL10	Interleukin 10
IFNG	Interferon gamma
CSF2	Colony stimulanting factor 2
TNF	Tumor necrosis fator
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
NGF-B	subunidade beta do NGF (a biologicamente ativa)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4	Neurotrophin 4
NGFR	Nerve growth factor receptor
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
NTRK3	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3

3.7. Análise estatística

Nas análises de 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. O nível de significância foi de $p < 0,05$. A análise estatística e a confecção dos gráficos foram feitas no programa *GraphPad Prism 4.02*.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais

A citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar as CTMs utilizadas neste trabalho. Em todas as culturas analisadas, cerca de 95-99% das células foram positivas para os marcadores CD29 e CD90 e cerca de 95-99% foram negativas para os marcadores CD45 e CD11b (Fig. 5). De acordo com a *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.* 2006) e Shyu *et al.* (2006), as CTMs devem apresentar em sua superfície os marcadores CD29 e CD90, porém não devem apresentar os marcadores CD45 e CD11b. Nossos resultados indicam que a técnica de cultivo utilizada foi eficiente para a obtenção de uma cultura purificada e enriquecida de CTMs.

4.2. Análise dos genes de referência

A análise revelou que todos os genes de referência (Tabela 2) avaliados não apresentaram diferença significativa na expressão entre as condições de cultivo 2D e 3D (Fig. 6). Com base nesta análise, os genes PGK1 e GUSB foram escolhidos como genes de referência para controle interno dos ensaios, pois tiveram as menores variações entre as duas condições.

4.3. Análise da expressão gênica das citocinas e do receptor CXCR4

Houve aumento significativo da expressão do gene de IL-1 β e do receptor CXCR4 na condição 3D (Fig. 7). A expressão dos genes de IL-1 α , IL-6, CSF2 e TNF α não apresentou variação significativa (Fig. 7). O gene de IL-10 apresentou expressão na condição 3D de todas as culturas, mas apenas em uma cultura na condição controle (2D) (Fig. 8). Portanto, o resultado obtido foi considerado como indução da expressão da IL-10 na condição 3D. A expressão de IFN- γ aconteceu em apenas uma das culturas, em ambas as condições. Não foi observada expressão dos genes de IL-2 e IL-4 em nenhuma

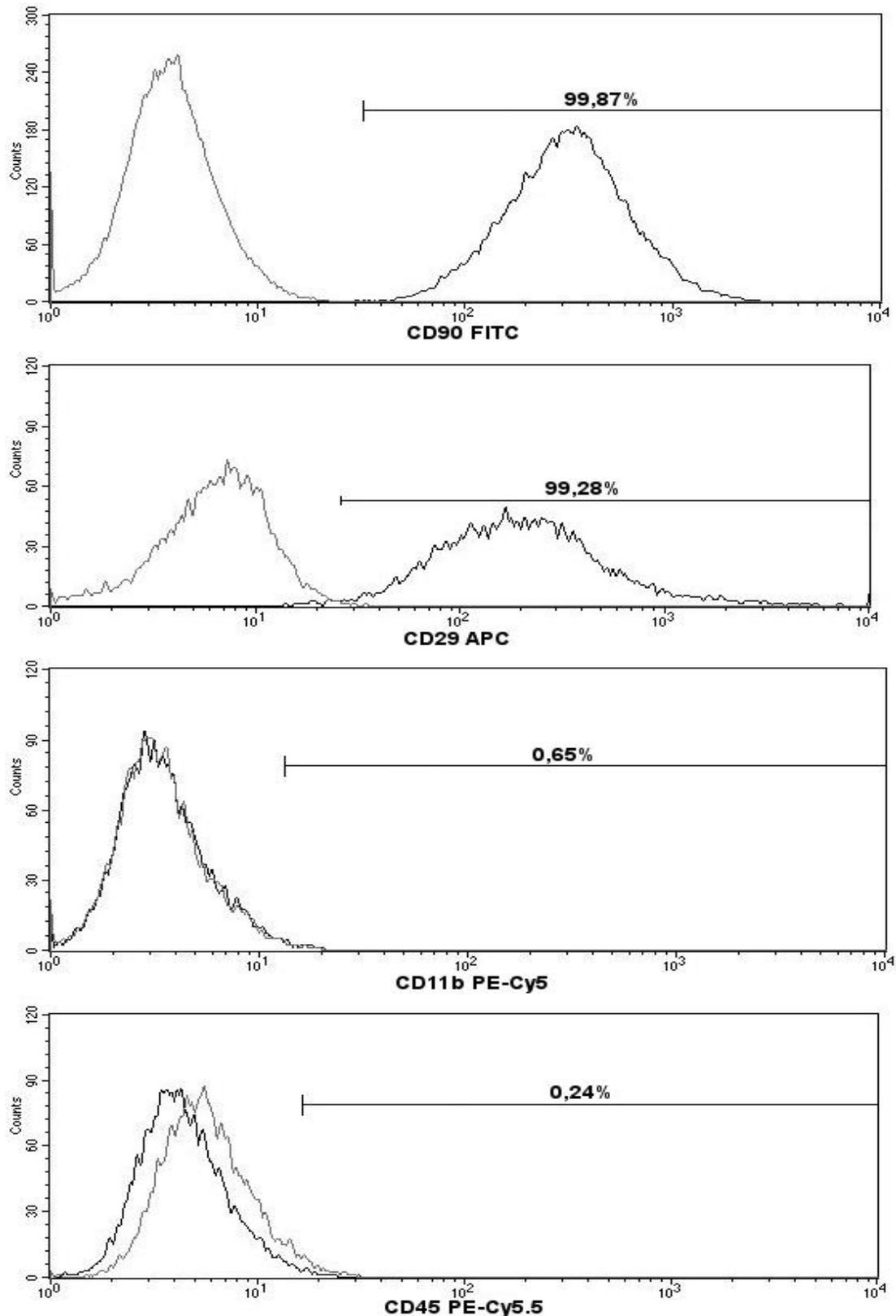


Figura 5 - Análise da expressão dos marcadores de superfície nas CTMs por citometria de fluxo. Resultado de uma cultura analisada com resultado representativo para todas as culturas analisadas. A linha cinza claro indica o controle de isoforma, enquanto a linha cinza escuro indica o marcador específico. Os marcadores positivos CD90 e CD29 foram identificados em mais de 99% das células. E os marcadores negativos CD11b e CD45 foram encontrados em menos de 1% das CTMs.

Análise da expressão dos genes de referência

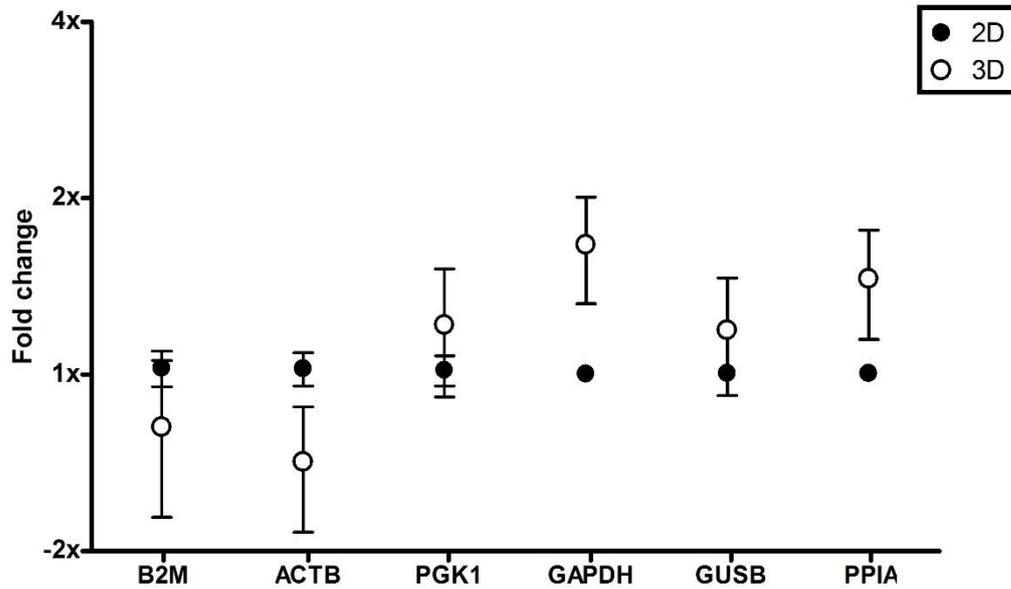


Figura 7 - Análise da expressão de genes de referência. Não foi observada diferença significativa na expressão dos seis genes de referência analisados. Os genes que apresentaram o *fold change* mais próximo a 1 na condição 3D foram o PGK1 e o GUSB. Os pontos com as barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). B2M, $p = 0,4$; ACTB, $p = 0,1$; PGK1, $p = 0,5$; GAPDH, $p = 0,07$; GUSB, $p = 0,3$; PPIA, $p = 0,2$; teste *t*.

Citocinas e receptor CXCR4

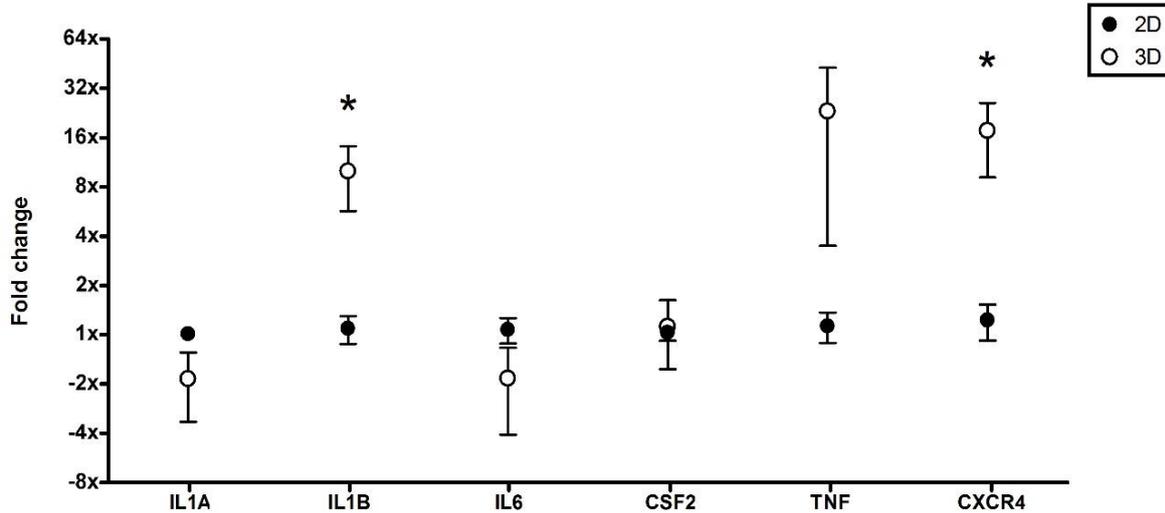


Figura 6 - Análise comparativa da expressão de citocinas e do receptor CXCR4 nas condições 2D e 3D. Foi observada diferença significativa entre as duas condições de cultivo apenas na expressão dos genes de IL-1 β e do receptor CXCR4 (* = $p < 0,05$; teste *t*). Os pontos com as barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). IL1A, $p = 0,1$; IL6, $p = 0,2$; CSF2, $p = 0,9$; TNF, $p = 0,3$; teste *t*.

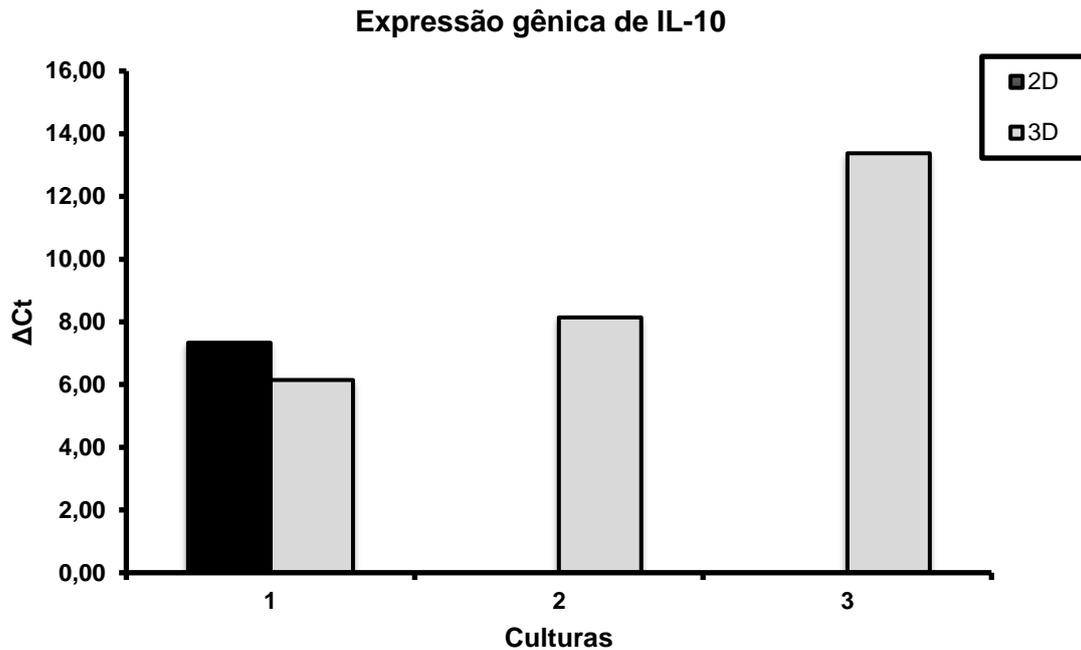


Figura 8 - Padrão de expressão de IL-10 nas condições 2D e 3D em cada uma das três culturas. Foi observada a expressão do gene de IL-10 na condição 3D de todas as culturas, mas apenas em uma cultura na condição controle (2D). As colunas representam o Δ Ct das culturas.

das culturas. Portanto, para os genes IFN- γ , IL-2 e IL-4, o resultado foi considerado inconclusivo.

4.4. Análise da expressão gênica das neurotrofinas

Houve aumento significativo da expressão dos genes de NGFR, NTRK1 e NTRK2 na condição 3D (Fig. 9). O gene do NGF- β foi o único a ter sua expressão significativamente reduzida na condição 3D (Fig. 9). Os genes de GDNF e NT-4 (NTF4) não apresentaram diferença significativa entre as duas condições (Fig. 9). Os genes NT-3 e seu receptor, NTRK3, apareceram em apenas uma das culturas realizadas, na condição 2D. O gene de BDNF não apresentou expressão em nenhuma das condições. Portanto, o resultado foi considerado inconclusivo para os genes NT-3, NTRK3 e BDNF.

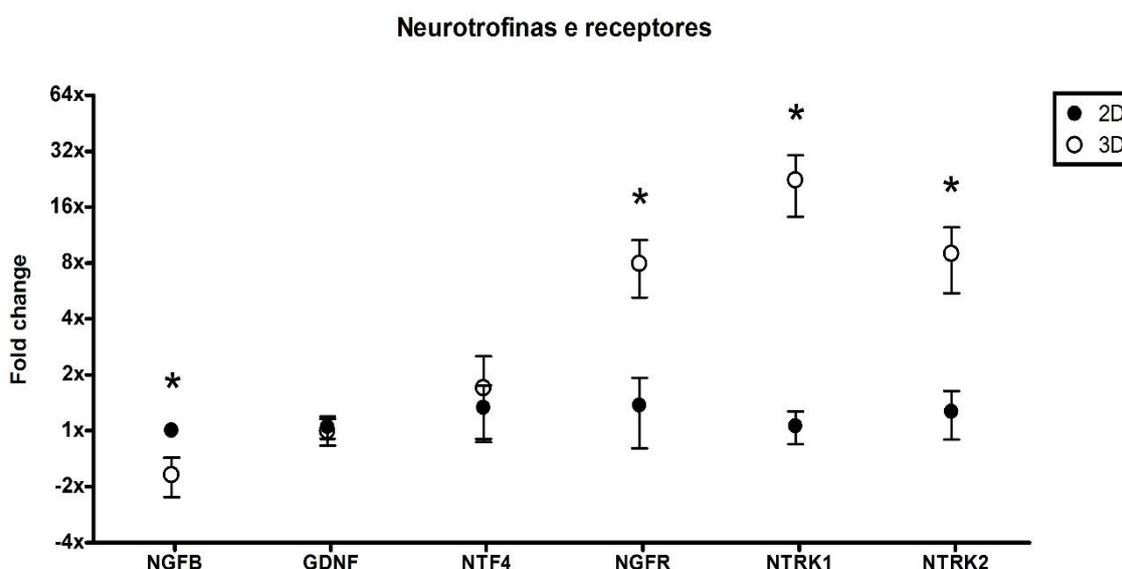


Figura 9 - Análise comparativa da expressão de neurotrofinas e seus receptores nas condições 2D e 3D. Foi observada diferença significativa entre as duas condições de cultivo na expressão dos genes de NGF- β , NGFR, NTRK1 e NTRK2 (* = $p < 0,05$; teste t). Os pontos com as barras de erro representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). GDNF, $p = 0,8$; NTF4, $p = 0,7$; teste t .

4.5. Resumo dos resultados

A maioria dos genes estudados no nosso trabalho apresentou expressão em todas as culturas e condições de cultivo, o que permitiu analisar sua expressão gênica. IL-10 foi o único gene que apresentou expressão consistente em apenas uma das condições de cultivo, sendo considerado induzido apenas nesta condição. Poucos genes tiveram resultado considerado inconclusivo. A Tabela 4 mostra um resumo de todos os resultados da análise de expressão gênica realizada em nosso estudo.

TABELA 4 - RESUMO DOS RESULTADOS.

Gene (sigla)	Número de culturas em que ocorreu expressão (n=3)	Condições em que ocorreu expressão	Resultado da expressão*
IL-1α	3	todas	sem alteração
IL-1β	3	todas	+
IL-2	0	-	inconclusivo ¹
IL-4	0	-	inconclusivo ¹
IL-6	3	todas	sem alteração
IL-10	3	só na 3D	indução na 3D
IFNG	1	todas	inconclusivo ²
CSF2	3	todas	sem alteração
TNF	3	todas	sem alteração
CXCR4	3	todas	+
NGF-β	3	todas	-
BDNF	0	-	inconclusivo ¹
GDNF	3	todas	sem alteração
NT-3	1	só na 2D	inconclusivo ²
NT-4	3	todas	sem alteração
NGFR	3	todas	+
NTRK1	3	todas	+
NTRK2	3	todas	+
NTRK3	1	só na 2D	inconclusivo ²

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

+: aumento.

-: 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

As células-tronco despertam o interesse de pesquisadores desde a sua descoberta devido às suas características. Já se sabe que o cultivo das CTMs em ambiente tridimensional em matriz de colágeno (3D) se aproxima mais do ambiente natural tecidual, promovendo maior interação entre as células cultivadas e a matriz, uma vez que oferece suporte mecânico às CTMs, característica esta que não é encontrada no tradicional cultivo bidimensional (LIU *et al.*, 2007). Neste contexto, se vê a importância do estudo da forma de cultivo das CTMs, essencial para futuros estudos. Uma das formas de se obter importantes elucidações sobre as diferenças entre as formas de cultivos dessas células se dá pelo estudo da expressão gênica.

Desta forma, o texto que se segue visa discutir o contexto e a importância dos resultados adquiridos nessa dissertação para os estudos futuros das CTMs.

5.1. Citocinas

As citocinas têm papel importante no perfil imunomodulatório celular, uma vez que atuam na comunicação entre as células vizinhas ou sobre as próprias células que as produziram, podendo assim regular a resposta inflamatória (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dentro das citocinas, temos o grupo das interleucinas, que podem ter ação pró- ou anti-inflamatórias. Seis membros deste grupo foram analisados no presente trabalho: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL10.

A expressão de IL-1 β aumentou significativamente no cultivo 3D. Esta interleucina tem ação pró-inflamatória, ativando o endotélio vascular e linfócitos, e co-estimulando APCs (ZHANG e AN, 2007; MURPHY, 2014). Este resultado sugere que o cultivo em 3D aumenta essa citocina pró-inflamatória, o que poderia ter um efeito que anularia uma possível ação anti-inflamatória da CTMs cultivada em 3D.

A expressão do gene de TNF não apresentou aumento significativo na condição 3D. A produção desta citocina pró-inflamatória é estimulada por outras citocinas, como IFN- γ , IL-1, IL-2, pelo CSF-2, entre outros elementos.

Em contrapartida, a sua produção é inibida pela IL-6 e IL-10 (VARELLA e FORTE, 2001; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Portanto, apesar do aumento observado não ter sido significativo, nossos resultados podem indicar que o aumento de IL-1 β pode ter uma relação com a tendência de aumento de TNF- α na condição 3D.

A IL-10 apresentou expressão apenas em uma das culturas da condição 2D, mas expressou-se em todas as culturas quando na condição 3D. Esta citocina tem propriedades anti-inflamatórias, impedindo a produção de IFN- γ pelas células NK e inibindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Por ter propriedades anti-inflamatórias, condiz com a característica imunomoduladora atribuída às CTMs (GAO *et al.*, 2016). A presença de IL-10 em culturas de CTMs já foi abordada em outros trabalhos, inclusive no que diz respeito a estimular a produção de IL-10 por células do sistema imune (NASEF; ASHAMMAKHI e FOUILLARD, 2008). O resultado sugere que a expressão de IL-10 é muito baixa ou inexistente na condição 2D, mas é induzida pelo ambiente 3D. Isto indica que o cultivo 3D tornou a ação das CTMs mais anti-inflamatória.

IL-1 α e IL-6 não apresentaram variação significativa entre as duas formas de cultivo. Ambas têm ação pró-inflamatória e a sua expressão em CTMs condiz com as informações encontradas no trabalho de Nakanishi e colaboradores (2011). O cultivo em ambiente 3D não altera significativamente a expressão de IL-1 α e IL-6, mas sugere uma tendência à redução das mesmas no modelo de cultivo 3D, o que pode indicar um perfil menos inflamatório nas CTMs cultivadas dessa forma.

O gene de CSF-2, também chamado de GM-CSF, foi expresso em ambas as condições, porém não apresentou diferenças significativas entre as mesmas. Sua expressão em CTMs condiz com a literatura (ZHU *et al.*, 2003), entretanto a forma de cultivo não alterou a sua expressão.

A expressão de IFN- γ aconteceu em apenas uma das três culturas, tanto na condição 2D quanto na 3D, mas sem alteração entre elas. Apesar de nossos resultados serem inconclusivos, em experimento com CTMs de camundongos, Liu *et al.* (2015) avaliou a ação de IFN- γ produzida por essas células na inibição da diferenciação de linfócitos, o que confirma que as CTMs podem expressar IFN- γ , apesar de termos analisado CTMs de ratos.

As interleucinas IL-2 e IL-4 foram as únicas que não apresentaram expressão em nenhuma das condições. Para assegurar que realmente não há expressão de IL-2 e IL-4 nas CTMs, será necessário avaliar a eficiência dos *primers* utilizados no experimento, testando-os em uma amostra que conhecidamente expressa essas interleucinas.

Em relação à expressão de citocinas, o aumento significativo de IL-1 β , uma interleucina pró-inflamatória, juntamente com a indução da expressão da interleucina anti-inflamatória IL-10, e a não alteração significativa da expressão de outras citocinas estudadas, sugerem que o cultivo das CTMs na condição 3D não direciona as CTMs a terem um perfil em um determinado sentido imunomodulador. Entretanto, pode sugerir que as CTMs se tornam mais ativas imunologicamente quando cultivadas em ambiente 3D.

5.2. Receptor CXCR4

O CXCR4 é o receptor da CXCL12, que atua em células de medula óssea CD34+, monócitos, células B, neutrófilos, células dendríticas, entre outras. Portanto, células que apresentam o receptor CXCR4 são atraídas para os locais da lesão, onde o CXCL12 é liberado (GUERREIRO *et al.*, 2011; MURPHY, 2014). Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que o sistema quimiotático CXCL12/CXCR4 está envolvido no tropismo das CTMs para áreas de lesão, especialmente em lesões do SNC (SHYU *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). O tecido nervoso lesionado expressa a quimiocina CXCL12 na periferia da lesão isquêmica, sendo esta expressão feita principalmente por astrócitos e células endoteliais (CUI *et al.*, 2007). As CTMs expressam o receptor CXCR4, e sua expressão aumenta quando estas células interagem com o tecido nervoso lesado (SHYU *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Além disso, diferentes estratégias que induzem o aumento da expressão do receptor CXCR4 pelas CTMs resultam em aumento da capacidade terapêutica destas células, promovendo o aumento da recuperação neurológica em modelos animais de isquemia cerebral (CUI *et al.*, 2007; BANG *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012).

Em nossos resultados foi observado que a expressão do gene do receptor CXCR4 aumentou significativamente quando as CTMs foram

cultivadas no ambiente 3D. Portanto, podemos concluir que as CTMs cultivadas em matriz 3D de colágeno estão mais propícias a serem quimioatraídas para a região da lesão, o que pode aumentar sua capacidade terapêutica. De fato, trabalhos na literatura têm demonstrado que o cultivo em 3D em matriz de colágeno aumenta a recuperação funcional promovida por estas células (QU *et al.*, 2011; MAHMOOD *et al.*, 2014; DE FREITAS *et al.*, 2015). Assim, nosso resultado indica que o cultivo em 3D pode ser mais uma estratégia para aumentar a expressão do receptor CXCR4, aumentando a quimioatração das CTMs por tecidos lesionados e, conseqüentemente, aumentando sua habilidade terapêutica.

5.3. Fatores neurotróficos e receptores de neurotrofinas

As análises desenvolvidas no presente estudo indicam que há a expressão de NGF pelas CTMs cultivadas na condição de cultivo convencional (2D), o que já foi descrito na literatura por outros autores (AUFFRAY *et al.*, 1996; CRIGLER *et al.*, 2006; SALGADO *et al.*, 2015; CASEIRO *et al.*, 2016). Além disso, nossos resultados mostraram que o NGF foi a única neurotrofina que teve a sua expressão reduzida na condição de cultivo 3D (mais especificamente, a sua subunidade funcional, a beta). Como esta neurotrofina está envolvida no reparo e recuperação funcional após danos ao tecido nervoso, este resultado pode sugerir uma diminuição de parte da capacidade neuroprotetora das CTMs quando cultivadas em ambiente 3D. Entretanto, isso não significa que estas células não sejam capazes de expressar o NGF quando em contato direto com o tecido nervoso lesado, como sugerem diversos trabalhos na literatura (CHEN *et al.*, 2002; SALGADO *et al.*, 2015), e futuros estudos são necessários para verificar a profundidade e a duração do efeito do cultivo em 3D na capacidade de expressão do NGF pelas CTMs. Por exemplo, em um estudo recente utilizando protocolo de cultivo de CTMs de rato em matriz 3D de colágeno semelhante ao nosso, foi observado aumento da expressão do NGF em relação ao cultivo em 2D (LEE *et al.*, 2014), o que poderia ser um resultado contraditório ao nosso. Entretanto, no referido trabalho a análise da expressão do NGF foi feita com no mínimo três dias de cultivo, ao contrário do nosso trabalho, onde a avaliação foi feita apenas com

um dia de cultivo. Estes resultados sugerem que o tempo de cultivo é um fator importante na expressão de NGF, e possivelmente também na expressão de vários outros genes. Nós optamos por avaliar o tempo de 24h de cultivo pois foi o protocolo adotado em diferentes estudos que visavam a administração intralesional das CTMs em colágeno em modelos de lesão cerebral (QU *et al.*, 2011; MAHMOOD *et al.*, 2014; DE FREITAS *et al.*, 2015), um dos focos de estudo do nosso grupo de pesquisa. Entretanto, os estudos precisam avançar no sentido de se avaliar diferentes condições, como tempo de cultivo, tipo de matriz 3D e demais fatores relevantes.

A observação de expressão dos fatores neurotróficos NT-4 e GDNF pelas CTMs em condição convencional de cultivo no nosso trabalho está de acordo com o já demonstrado pela literatura (LEE *et al.*, 2014; CASEIRO *et al.*, 2016). Com relação à NT-4, de acordo com o trabalho de Crigler *et al.* (2006), esta neurotrofina não é expressa em CTMs humanas em cultivo convencional. Em nosso trabalho utilizamos CTMs de ratos, o que pode justificar a discrepância nos resultados. Com relação ao efeito do cultivo ao cultivo em 3D, nossos resultados mostraram que esta condição não alterou o nível de expressão gênica destes dois fatores neurotróficos. Com relação à NT-4, nosso resultado está de acordo com o observado em um estudo utilizando protocolo de cultivo de CTMs de rato em matriz 3D de colágeno semelhante ao nosso, onde também não foi observada diferença na sua expressão entre as condições 2D e 3D após três dias de cultivo (LEE *et al.*, 2014). Ao contrário do observado na expressão gênica do NGF, onde parece haver inversão do efeito na expressão entre um e três dias de cultivo em 3D, no caso do NT-4 o tempo não parece ser um fator tão relevante (pelo menos até o tempo de três dias de cultivo). Isto só demonstra a complexidade dos fatores envolvidos na expressão gênica e a variabilidade dos efeitos dos diversos fatores entre diferentes genes, ainda que pertencentes a uma mesma classe estrutural e/ou funcional.

Os nossos resultados da expressão gênica da NT-3 e do seu receptor, NTRK3, foram considerados inconclusivos por apresentarem expressão em apenas uma das três culturas analisadas, e somente na condição 2D (Tabela 4). Com relação a expressão da NT-3, Crigler *et al.* (2006) avaliou CTMs humanas por qPCR e não obteve expressão de NT-3. Apesar de nosso

resultado ser inconclusivo, ele sugere uma baixa tendência de expressão do NT-3 nas CTMs, estando de acordo com o trabalho citado. Entretanto, outros trabalhos têm descrito a expressão de NT-3 por CTMs em condição de cultivo convencional (2D) (LEE *et al.*, 2014; CASEIRO *et al.*, 2016). Em estudo com CTMs de rato cultivadas em protocolos similares às duas condições avaliadas no nosso trabalho foi observada expressão da NT-3, sem ocorrência de diferença entre os cultivos em 2D e 3D (LEE *et al.*, 2014). Os nossos resultados inconclusivos, bem como a discrepância de resultados observados na literatura, indicam que mais estudos precisam ser realizados para que a expressão gênica da NT-3 e do seu receptor pelas CTMs seja melhor compreendida.

Em nossa análise não foi observada expressão gênica da neurotrofina BDNF em nenhuma das condições de cultivo. Apesar desta observação sugerir que o BDNF não é expresso pelas CTMs, este resultado foi considerado inconclusivo pois a verificação da eficácia do primer utilizado ainda precisa ser realizada (Tabela 4). A expressão do BDNF pelas CTMs em condição de cultivo convencional tem sido descrita na literatura (CRIGLER *et al.*, 2006; SALGADO *et al.*, 2015; CASEIRO *et al.*, 2016). Entretanto, na própria literatura existem resultados divergentes com relação à expressão do BDNF por estas células. Por exemplo, a expressão do BDNF não foi observada em CTMs humanas após um dia de cultivo em 2D (CHEN *et al.*, 2002), de forma similar ao nosso resultado com CTMs de rato. Entretanto, a expressão do BDNF foi observada em tempos maiores de cultivo (quatro e sete dias) (CHEN *et al.*, 2002). Em estudo com CTMs de rato foi observada expressão do BDNF na condição 2D após três dias de cultivo, com aumento desta expressão induzido pelo cultivo em 3D (matriz de colágeno) (LEE *et al.*, 2014). As divergências na literatura podem indicar diferenças nas espécies ou nos protocolos utilizados, mas também sugerem que mais estudos ainda precisam ser realizados para clarificar o perfil de expressão desta importante neurotrofina pelas CTMs.

Os nossos resultados mostraram que, com exceção do NTRK3, que teve resultado inconclusivo (Tabela 4), todos os receptores de neurotrofinas analisados tiveram a sua expressão gênica aumentada significativamente no cultivo 3D: o NGFR, que pode se ligar com baixa afinidade às quatro neurotrofinas avaliadas (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4); o NTRK1, que se liga ao

NGF e ao NT-3; e o NTRK2, que se liga ao BDNF e ao NT-4. Estudos prévios já haviam identificado a expressão dos genes dos receptores NTRK1 e NTRK2 em CTMs cultivadas em ambiente 2D (HERMANN *et al.*, 2004; BLONDHEIM *et al.*, 2006). Em um estudo onde foi comparada a expressão diferencial de inúmeros genes entre CTMs cultivadas em 2D e 3D (com matriz de colágeno) foi verificado o aumento da expressão do NGFR na condição 3D (QU *et al.*, 2011), estando de acordo com o resultado obtido no nosso estudo. Portanto, os nossos resultados indicam que as CTMs podem ficar mais responsivas aos fatores neurotróficos quando cultivadas em ambiente 3D. Entretanto, a redução da expressão da subunidade ativa do NGF (NGF- β) e a não alteração na expressão nas demais neurotrofinas sugerem que o simples cultivo em 3D não aumenta a potencial neuroprotetor das CTMs. Esse potencial, que é amplamente demonstrado na literatura em diversos modelos de lesão do SNC, possivelmente é induzido quando as CTMs entram em contato com o tecido nervoso lesado. Neste contexto, o aumento da expressão dos receptores de neurotrofinas em cultivo 3D observado no nosso trabalho podem ter um papel importante neste mecanismo, uma vez que as CTMs cultivadas em 3D podem ficar mais sensíveis ao reconhecimento de um ambiente de tecido nervoso lesionado, onde ocorre o aumento da liberação das neurotrofinas por células neurais (PEZET e MCMAHON, 2006; SEBBEN *et al.*, 2011).

Nossos resultados não esgotam a questão levantada aqui, mostrando a necessidade de aprofundar os estudos, analisando as CTMs sob outras condições, como a influência do tecido nervoso normal ou lesionado durante o cultivo dessas células, a fim de avaliar como a presença de fatores teciduais afetam o seu perfil de expressão gênica. Além disso, neste trabalho foi visto apenas o efeito do cultivo em 3D na transcrição gênica. Estudos do nosso grupo já estão em andamento no sentido de verificar o efeito deste cultivo na expressão total de proteínas. E estes futuros resultados certamente irão enriquecer ainda mais a avaliação fenotípica e funcional da influência dos dois tipos de cultivo, amplificando nossa compreensão sobre seus efeitos nas propriedades terapêuticas destas células que representam atualmente uma grande esperança para o tratamento de inúmeras patologias que envolvem

lesão tecidual e inflamação. Em especial as que envolvem lesões do SNC, patologias estas que são as maiores responsáveis por morte e incapacitação de pessoas no mundo atual.

6. CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que o simples cultivo das CTMs na malha de colágeno (ambiente 3D) não altera de forma evidente o perfil imunomodulador destas células. Entretanto, como ocorre o aumento da expressão de uma citocina pró-inflamatória (IL-1 β) e de uma anti-inflamatória (IL-10), possivelmente o cultivo em 3D pode tornar as CTMs mais imunologicamente ativas, tornando-as mais rapidamente atuantes quando elas interagem diretamente com os fatores presentes no tecido lesionado.

As CTMs cultivadas no modelo 3D podem se tornar mais responsivas à quimiocina CXCL12 normalmente liberada por tecidos lesionados, visto que a expressão dos receptores CXCR4 aumentou, sugerindo um aumento da eficácia terapêutica das CTMs cultivadas no modelo 3D.

Os nossos resultados também sugerem que o simples cultivo das CTMs no ambiente 3D não as tornam mais neuroprotetoras, visto que não aumentam a expressão de neurotrofinas. Sugere também que as CTMs podem se tornar mais responsivas aos fatores neurotróficos, uma vez que a expressão dos receptores NGFR, NTRK1 e NTRK2 aumentou significativamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7^a. ed. [s.l.] Elsevier Brasil, 2012.

AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 383-394, 2002.

AUFFRAY, I.; CHEVALIER, S.; FROGER, J.; IZAC, B.; VAINCHENKER, W.; GASCAN, H.; COULOMBEL, L. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. **Blood**, v. 88, n. 5, p. 1608–18, 1996.

BANG, O. Y.; JIN, K. S.; HWANG M. N.; KANG, H. Y.; KIM, B. J.; LEE, S. J.; KANG, S.; HWANG, Y. K.; AHN, J. S.; SUNG, K. W. The effect of CXCR4 overexpression on mesenchymal stem cell transplantation in ischemic stroke. **Cell medicine**, v. 4, n. 2, p. 65-76, 2012.

BAXTER, M. A.; WYNN, R. F.; JOWITT, S. N.; WRAITH, J E.; FAIRBAIRN, L. J.; BELLANTUONO, I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. **Stem cells**, v. 22, n. 5, p. 675–682, 2004.

BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell–matrix adhesion. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 3, p. 565-573, 2007.

BLONDHEIM, N. R.; LEVY, Y. S.; BEN-ZUR, T.; BURSHEIN, A.; CHERLOW, T.; KAN, I.; BARZILAI, R.; BAHAT-STROMZA, M.; BARHUM, Y.; BULVIK, S.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. **Stem cells and development**, v. 15, n. 2, p. 141-164, 2006.

CASEIRO, A. R.; PEREIRA, T.; IVNOVA, G.; LUÍS, A. L.; MAURÍCIO, A. C. Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. **Stem cells international**, v. 2016.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–49, 2007.

CHEN, X.; KATAKOWSKI, M.; LI, Y.; LU, D.; WANG, L.; ZHANG, L.; CHEN, J.; XU, Y.; GAUTAM, S.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. **Journal of neuroscience research**, v. 69, n. 5, p. 687-691, 2002.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2002.

CRIGLER, L.; ROBEY, R. C.; ASAWACHAICHARN, A.; GAUPP, D.; PHINNEY, D. G. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. **Experimental Neurology**, v. 198, n. 1, p. 54–64, 2006.

CUI, X.; CHEN, J.; ZACHAREK, A.; LI, Y.; ROBERTS, C.; KAPKE, A.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M. Nitric Oxide Donor Upregulation of Stromal Cell-Derived Factor-1/Chemokine (CXC Motif) Receptor 4 Enhances Bone Marrow Stromal Cell Migration into Ischemic Brain After Stroke. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2777-2785, 2007.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D. R.; YAMADA, K. M. Taking Cell-Matrix Adhesion to the Third Dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 2001.

DE FREITAS, H. T.; DA SILVA, V. G.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.

DE FREITAS, H. T.; REBEL, M. G.; COELHO, B. P.; DA SILVA, V. G.; GALAXE-ALMEIDA, G. G. C.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. 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.

DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

DEVINE, S. M.; COBBS, C.; JENNINGS, M.; BARTHOLOMEW, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 2999–3001, 2003.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J. 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.

DOS SANTOS, A. V.; REIS, J. C.; PAREDES, B. D.; MORAES, L.; JASMIN.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**, v. 1306, p. 149–158, 2010.

FAUCI, A. S.; LANGFORD, C. A. **Reumatologia de Harrison**. 3^a. ed. [s.l.] AMGH Editora, 2014.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATSINIK, N. V.; PANASYUK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. V.. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. **Transplantation**, v. 17, p. 331–340, 1974.

GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. A. L.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H-L.; TSE, H-F.; FU, Q-L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell death & disease**, v. 7, n. 1, p. e2062, 2016.

GIANNONE, G.; SHEETZ, M. P. Substrate rigidity and force define form

through tyrosine phosphatase and kinase pathways. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 213–223, 2006.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Med Port**, v. 24, n. 9, p. 67-76, 2011.

HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, M. O.; FIEDLER, J.; BOEHM, B. O.; MAISEL, M.; LERCHE, H.; SCHWARZ, J.; BRENNER, R.; STORCH, A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 19, p. 4411–4422, 2004.

HERVY, M.; HOFFMAN, L.; BECKERLE, M. C. From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 5, p. 524–532, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 11^a. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524 p., 2008.

KAN, I.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 1, p. 31–41, 2005.

KANDRATAVICIUS, L.; MONTEIRO, M. R.; SILVA, R. A. V.; LEITE, J. P. Neurotrofinas na epilepsia do lobo temporal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 1, p. 7–12, 2010.

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.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C. Dor neuropática:

aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 5, p. 492–505, 2008.

LEE, J. H.; LEE, J. Y.; YANG, S. H.; LE, E. J.; KIM, H. W. Carbon nanotube–collagen three-dimensional culture of mesenchymal stem cells promotes expression of neural phenotypes and secretion of neurotrophic factors. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4425-4436, 2014.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–126, 2000.

LINS, R. D.; LUCENA, K. C.; FERREIRA, R. C.; SILVEIRA, É. J.; PINTO, L.; GOMES, R. C. As citocinas e o periodonto: o papel dos factores de crescimento na saúde periodontal. **International Journal of Dentistry**, v. 9, n. 1998, p. 38–43, 2010.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research**, v. 85, n. 1, p. 1051–1064, 2007.

LIU, X.; REN, R.; QU, X.; GE, C.; CHENG, K.; ZHAO, R. C. H. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN- γ -mediated SOCS3 activation. **Immunologic research**, v. 61, n. 3, p. 219-229, 2015.

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, n. 4, p. 402–408, 2001.

LU, D.; MAHMOOD, A.; WANG, L.; LI, Y.; LU, M.; CHOPP, M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. **Neuroreport**, v. 12, n. 3, p. 559–563, 2001.

LUNN, J. S.; SAKOWSKI, S. A.; HUR, J.; FELDMAN, E. L. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 3, p. 353–361, 2011.

MAHMOOD, A. D.; LU; CHOPP, M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. **J. Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 2004.

MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D. B.; ROITT, I. M. **Imunologia**. 8^a. ed. [s.l.] Elsevier Brasil, 2014.

MENDEZ-OTERO, R.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; PIMENTEL-COELHO, P. M.; FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 55 21, p. 99–103, 2009.

MORGANI, S. M.; CANHAM, M. A.; NICHOLS, J.; SHAROV, A. A.; MIGUELES, R. P.; KO, M. S. H.; BRICKMAN, J. M. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. **Cell Reports**, v. 3, n. 6, p. 1945–1957, 2013.

MORIGI, M.; IMBERTI, B.; ZOJA, C.; CORNA, D.; TOMASONI, S.; ABBATE, M.; ROTTOLI, D.; ANGIOLETTI, S.; BENIGNI, A.; PERICO, N.; ALISON, M.; REMUZZI, G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 7, p. 1794–1804, 2004.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 888 p., 2014.

NAKAGAWA, H.; AKITA, S.; FUKUI, M.; FUJII, T.; AKINO, K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 1, p. 29–36, 2005.

NAKANISHI, C.; NAGAYA, N.; OHNISHI, S.; YAMAHARA, K.; TAKABATAKE, S.; KONNO, T.; HAYASHI, K.; KAWASHIRI, M.; TSUBOKAWA, T.; YAMAGISHI, M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. **Circulation Journal**, v. 75, n. 9, p. 2260-2268, 2011.

NASEF, A.; ASHAMMAKHI, N.; FOUILLARD, L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 531–546, 2008.

PEZET, S.; MCMAHON, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 507–538, 2006.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896–2902, 2007.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. April, p. 71–74, 1997.

QU, C.; MAHMOOD, A.; LIU, X. S.; XIONG, Y.; WANG, L.; WU, H.; LI, B.; ZHANG, Z. G.; KAPLAN, D. L.; CHOPP, M. 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.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A; ARYA, J.; HARKEN, A.H. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 3, p. 268-273, 2002.

SALEM, Husein K.; THIEMERMANN, Chris. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem cells**, v. 28, n. 3, p. 585-596, 2010.

SALGADO, A. J.; SOUSA, J. C.; COSTA, B. M.; PIRES, A. O.; MATEUS-PINHEIRO, A.; TEIXEIRA, F. G.; PINTO, L.; SOUSA, N. Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, art. 249, 2015.

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.

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.

SEBBEN, A. D.; COCOLICHIO, F.; SCHMITT, A. P. V.; CURRA, M. D.; DA SILVA, P. V.; TRES, G. L.; SILVA, J. B. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 81–89, 2011.

SHI, S.; MIURA, M.; SEO, B. M.; ROBEY, P. G.; BARTOLD, P. M.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 8, n. 3, p. 191–199, 2005.

SHYU, W. C.; LEE, Y. J.; LIU, D. D.; LIN, S. Z.; LI, H. Homing genes, cell therapy and stroke. **Front Biosci**, v. 11, n. 1, p. 899-907, 2006.

SHYU, K. G.; WANG, B. W.; HUNG, H. F.; CHANG, C. C.; SHIH, D. T. B. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. **Journal of biomedical science**, v. 13, n. 1, p. 47-58, 2006.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5391, p. 1145–7, 1998.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726-736, 2008.

UNIPROT. **Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16 - NGFR** - *Homo sapiens* (Human). Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P08138>>. Acesso em: 1 jun. 2016a.

UNIPROT. **Beta-nerve growth factor - Homo sapiens (Human)**. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P01138>>. Acesso em: 1 jun. 2016b.

UNIPROT. **Brain-derived neurotrophic factor - Homo sapiens (Human)**. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P23560>>. Acesso em: 1 jun.

2016c.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas : revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146–154, 2001.

WANG, Y.; DENG, Y.; ZHOU, GQ. SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. **Brain research**, v. 1195, p. 104-112, 2008.

WANG, P. P.; WANG, J. H.; YAN, Z. P.; HU, M. Y.; LAU, G. K.; FAN, S. T.; LUK, J. M. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 3, p. 712–716, 2004.

XU, W.; ZHANG, X.; QIAN, H.; ZHU, W.; SUN, X.; HU, J.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 7, p. 623–631, 2004.

YU, X.; CHEN, D.; ZHANG, Y.; WU, X.; HUANG, Z.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z. Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 316, n. 1, p. 141-149, 2012.

YU, J.; THOMSON, J. Pluripotent stem cell lines. **Genes & development**, v. 22, n. 15, p. 1987-1997, 2008..

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.

ZHAO, Q.; REN, H.; HAN, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. **Journal of Cellular Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 3–20, 2015.

ZHU, G. R.; ZHOU, X. Y.; LU, H.; ZHOU, J. W.; LI, A. P.; XU, W.; LI, J. Y.; WANG, C. Y. Human bone marrow mesenchymal stem cells express multiple

hematopoietic growth factors. **Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology**, v. 11, n. 2, p. 115-119, 2003.