SIMONE ORTIZ MOURA FIDELES

Análise da expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais e de osteoblastos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Biblioteca Central USP Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Fideles, Simone Ortiz Moura

Análise da expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais e de osteoblastos. Ribeirão Preto, 2018.

62 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus.

1. Células-tronco. 2. Osteoblastos. 3. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Simone Ortiz Moura Fideles

Título: Análise da expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais e de osteoblastos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada família.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família por estarem comigo nesta jornada.

Ao magnífico Reitor da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Vahan Agopyan.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, representada pela Diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Oral, coordenado pelo Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti e ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por confiarem a mim a realização deste projeto e por me concederem constante apoio, dedicação e valiosos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Geraldo A. Passos e equipe, pela participação na execução deste projeto.

A todos os professores, funcionários, técnicos de laboratório e alunos pelos ensinamentos, contribuições e pela convivência.

À Capes, pelo suporte financeiro.

“...Meu jovem Professor, quem mais ensina e quem mais aprende?

O professor ou o aluno?

Feliz é o professor que aprende ensinando...”

Cora Coralina

RESUMO

FIDELES, S. O. M. **Análise da expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais e de osteoblastos.** 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A terapia celular baseada na utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs) tem sido considerada uma estratégia promissora para regenerar o tecido ósseo. Apesar da medula óssea constituir a principal fonte de CTMs, o tecido adiposo tem sido investigado como uma fonte alternativa, devido a maior disponibilidade e facilidade de obtenção dessas células. Porém, as CTMs obtidas de fontes distintas podem exibir diferenças a nível molecular, que ainda não estão esclarecidas pela literatura e que poderiam influenciar o potencial regenerativo dessas células. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi comparar os perfis de expressão gênica em larga escala de CTMs isoladas da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) de ratos, e de osteoblastos (OBs) diferenciados a partir dessas células (OBs-MO e OBs-TA, respectivamente). As células foram cultivadas em meio de crescimento para manutenção das características de CTMs ou em meio osteogênico para indução da diferenciação osteoblástica. O RNA total das células foi extraído e a análise genômica foi realizada pela tecnologia de microarray utilizando lâminas Agilent 4x44k. Os perfis de expressão gênica foram analisados pelo software GeneSpring 14.8 GX, considerando o tecido de origem (CTMs-TA vs CTMs-MO e OBs-TA vs OBs-MO) e a diferenciação celular (OBs-MO vs CTMs-MO e OBs-TA vs CTMs-TA) como parâmetros de comparação entre os grupos (fold change ≥ 2.0 ; $p \leq 0.05$). Os dados do microarray foram confirmados por PCR em tempo real para todos os genes de interesse avaliados. Os perfis de expressão gênica entre as CTMs obtidas de fontes distintas (CTMs-TA vs CTMs-MO) e entre os OBs diferenciados a partir destas células (OBs-TA vs OBs-MO) mostraram que as células provenientes da medula óssea apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados à osteogênese enquanto que, as células provenientes do tecido adiposo, uma sobre-expressão de genes relacionados à angiogênese, independente da diferenciação celular. Adicionalmente, as células provenientes do tecido adiposo (CTMs e OBs) apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica. Esses resultados, em conjunto, mostraram que as células preservaram características do tecido de origem. As análises comparativas entre as células indiferenciadas e diferenciadas obtidas da mesma fonte (OBs-MO vs CTMs-MO e OBs-TA vs CTMs-TA) mostraram que as CTMs, independente do tecido de origem, apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados

com os processos de angiogênese, diferenciação osteoblástica e morfogênese do osso, o que sugere que as CTMs podem estar mais envolvidas com os eventos iniciais que regem o processo regenerativo que os OBs. A análise do dendrograma mostrou que os OBs-TA apresentaram um padrão de expressão gênica mais próximo ao das CTMs, em termos de similaridade e, os OBs-MO, um padrão mais distante, o que sugere que os OBs-MO possam ter atingido um estágio de diferenciação celular mais avançado que os OBs-TA. Os resultados mostraram diferenças moleculares entre as populações de células que poderiam implicar em utilizações terapêuticas específicas, sugerindo que as células provenientes do tecido adiposo seriam mais indicadas para terapias angiogênicas enquanto que, as células provenientes da medula óssea, mais indicadas para terapias osteogênicas.

Palavras-chave: Células-tronco. Osteoblastos. Expressão Gênica.

ABSTRACT

FIDELES, S. O. M. **Large-scale gene expression analysis of mesenchymal stem cells and osteoblasts**. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Cell therapy based on the use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been considered a promising strategy to regenerate bone tissue. Although bone marrow represents the main source of MSCs, adipose tissue has been investigated as an alternative source due to the greater availability and ease of isolation of these cells. However, MSCs obtained from different sources may show differences at the molecular level, which are not yet established in the literature and that could influence the regenerative potential of these cells. Thus, the aim of this study was to compare the large-scale gene expression profiles of MSCs isolated from bone marrow (BM-MSCs) and adipose tissue (AT-MSCs) of rats, and of the osteoblasts differentiated from these cells (BM-OBs and AT-OBs, respectively). Cells were cultured in growth medium to maintain the characteristics of MSCs or in osteogenic medium to induction of osteoblastic differentiation. Total RNA was extracted and genomic analysis was performed by microarray technology using Agilent 4x44k slides. The gene expression profiles were analyzed by GeneSpring 14.8 GX software, considering the source (AT-MSCs vs BM-MSCs and AT-OBs vs BM-OBs) and cell differentiation (BM-OBs vs BM-MSCs and AT-OBs vs AT-MSCs) as parameters of comparison between the groups (fold change ≥ 2.0 ; $p \leq 0.05$). The microarray data were confirmed by real-time PCR for all the interest genes evaluated. The gene expression profiles between the MSCs obtained from different sources (AT-MSCs vs BM-MSCs) and between the OBs differentiated from these cells (AT-OBs vs BM-OBs) showed that the cells from the bone marrow presented an overexpression of genes related to osteogenesis whereas the cells from adipose tissue showed an overexpression of genes related to angiogenesis, independent of cell differentiation. In addition, cells from adipose tissue (MSCs and OBs) showed an overexpression of genes related to adipogenic differentiation. These results, together, showed that the cells preserved characteristics of the source. Comparative analyses between the undifferentiated and differentiated cells obtained from the same source (BM-OBs vs BM-MSCs and AT-OBs vs AT-MSCs) showed that MSCs, regardless of source, showed an overexpression of genes related to the angiogenesis, osteoblastic differentiation and bone morphogenesis process, suggesting that MSCs may be more involved with the early events that govern the regenerative process than OBs. Dendrogram analysis showed that AT-OBs had a gene expression profile closer to MSCs in terms of similarity and the BM-OBs had a more distant

profile, suggesting that BM-OBs may have reached a stage of cell differentiation more advanced than AT-OBs. The results showed molecular differences between cell populations that could imply in specific therapeutic uses, suggesting that cells derived from adipose tissue would be better suited for angiogenic therapies, whereas bone marrow cells are more suitable for osteogenic therapies.

Keywords: Stem cells. Osteoblasts. Gene expression.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Proposição.....	18
3	Materiais e Métodos.....	18
3.1	Animais.....	18
3.2	Obtenção e cultura de CTMs.....	19
3.2.1	Obtenção e cultura de CTMs derivadas da medula óssea.....	19
3.2.2	Obtenção e cultura de CTMs derivadas do tecido adiposo.....	19
3.3	Manutenção das características de CTMs e diferenciação osteoblástica.....	20
3.4	Quantificação e avaliação da integridade do RNA total.....	20
3.5	Oligo microarray.....	21
3.5.1	Preparo das amostras.....	21
3.5.2	Síntese do cDNA.....	21
3.5.3	Síntese, amplificação e marcação do cRNA.....	22
3.5.4	Purificação do cDNA.....	22
3.5.5	Quantificação do cRNA.....	22
3.5.6	Hibridização.....	22
3.5.7	Lavagem das lâminas de microarray.....	23
3.5.8	Escaneamento e extração dos dados.....	23
3.5.9	Análise dos dados do microarray.....	23
3.5.10	Confirmação dos dados por PCR em tempo real.....	24
4	Resultados.....	25
4.1	Avaliação da integridade do RNA total.....	25
4.2	Análise dos mRNA diferencialmente expressos.....	25
4.3	Confirmação dos dados do microarray por PCR em tempo real.....	42

5	Discussão.....	44
6	Conclusões.....	47
	Referências.....	49
	Anexo A – Ofício da Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP/USP.....	61
	Anexo B – Arquivo completo dos genes com fold-change ≥ 2.0.....	62

1 Introdução

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células e por uma matriz extracelular mineralizada que está em constante remodelação (Meguid et al., 2017). Além deste processo fisiológico e contínuo, o osso apresenta uma grande capacidade de regeneração quando lesado por traumas, doenças, processos infecciosos e neoplasias (Pittinger et al., 1999; Waese et al., 2008; Zwingenberger et al., 2012). Porém, dependendo da natureza e da extensão da injúria, bem como das condições locais e sistêmicas, a regeneração do tecido pode ser comprometida (Zwingenberger et al., 2012). Nestes casos, torna-se necessário realizar intervenções terapêuticas com a finalidade de restaurar o tecido lesado (Brydone et al., 2010; Smith et al., 2011; Black et al., 2015; Verrier et al., 2016).

Nesse contexto, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para investigar estratégias terapêuticas capazes de promover, com segurança e eficácia, a regeneração do tecido ósseo, como é o caso da utilização de enxertos e substitutos ósseos (Oryan et al., 2014). No entanto, esses tratamentos têm mostrado algumas desvantagens e limitações quanto à aplicação das técnicas e materiais utilizados e, em muitos casos, a regeneração completa do tecido não é obtida (Younger et al., 1989; Moore et al., 2001; Zwingenberger et al., 2012; Oryan et al., 2014). Por outro lado, estratégias de medicina regenerativa baseadas no uso de células têm mostrado resultados promissores na regeneração do tecido ósseo (Undale et al., 2009; Hauzeur et al., 2010; Murphy et al., 2013; Oryan et al., 2017; Trohatou et al., 2017).

O crescente interesse pelo uso de células iniciou-se em 1867, a partir da hipótese do patologista Cohnheim de que fibroblastos derivados da medula óssea estariam envolvidos em processos de cicatrização de lesões no corpo (Cohnheim, 1967). Mais tarde, Friedenstein et al. conduziram uma série de estudos entre 1966 e 1976, em que verificaram que uma subpopulação minoritária de células isoladas da medula óssea apresentava potencial osteogênico e se distinguia das demais pela sua capacidade de aderência ao plástico, o que permitia seu isolamento e cultivo. Essa subpopulação de células foi descrita como células formadoras de colônias fibroblásticas, devido ao seu aspecto morfológico e a sua capacidade de formar colônias (Friedenstein et al., 1966; 1970; 1974; 1976). O conceito de células-tronco mesenquimais foi introduzido por Caplan, em 1991, que observou que essa população de células era capaz de gerar vários tecidos mesodérmicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Caplan, 1991; Goshima et al., 1991; Bianco et al. 2008).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas, caracterizadas por apresentarem alto potencial de proliferação, capacidade de auto renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens de células especializadas, como osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos. (Owen et al., 1988; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999). Assim sendo, as CTMs exercem um importante papel na manutenção do reservatório de células indiferenciadas presentes na maioria dos tecidos do organismo e, por isso, contribuem para a regeneração de tecidos e órgãos (Pittenger et al., 1999; Caplan, 2005). Há estudos que sugerem que as CTMs, quando submetidas a certas condições específicas, podem ser capazes de assumir características fenotípicas de células especializadas de tecidos de origem endodérmica e ectodérmica, o que representaria um avanço no tratamento de diversas doenças, como por exemplo, moléstias hepáticas e desordens do sistema nervoso central. (Kopen et al., 1999; Forbes et al., 2002; Sato et al., 2005; Donald et al., 2007; Eckert et al., 2013; Vallone et al., 2013; Almalki et al., 2016).

Ainda com respeito a caracterização das CTMs, estudos mostraram que essas células, quando cultivadas *in vitro*, não expressam um marcador específico de membrana, o que levou a Sociedade Internacional de Pesquisa com Células Tronco (ISSCR - International Society for Stem Cell Research), a estabelecer critérios mínimos para a caracterização dessas células (Dominici et al., 2006). De acordo com esses critérios, as CTMs devem apresentar capacidade de aderência ao plástico, capacidade de diferenciação *in vitro* em diversas linhagens (osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas), expressão positiva para os marcadores CD 105, CD 73 e CD 90 e negativa para os marcadores CD 45, CD 34, CD 11b, CD 14e CD 79a e HLA-DR.

A descoberta do potencial regenerativo das CTMs deu início a muitos estudos clínicos para tratamento de pacientes acometidos por fraturas ósseas, como os realizados por Connolly et al. (1986; 1998) que participaram 100 pacientes com fraturas não consolidadas na tíbia. O tratamento consistiu na aspiração de células da medula óssea dos próprios pacientes, as quais foram imediatamente transplantadas por injeção local diretamente nos sítios de fratura. Exceto em dois casos, todos os pacientes receberam uma única injeção de células. Entre 6 a 10 meses após o procedimento, a cicatrização óssea foi constatada em 80% dos casos. Healey et al., em 1990, também obtiveram sucesso em 7 de 8 pacientes que apresentavam fraturas e defeitos ósseos decorrentes de enxertos mal sucedidos realizados para reconstruir áreas afetadas por sarcoma e que foram tratados pelo mesmo método. Em 1993, Garg et al. realizaram um com 20 pacientes que receberam duas aplicações de células nos locais de fratura, com intervalo

de 3 meses entre as injeções. Após 3 a 7 meses, a formação óssea foi constatada em 17 pacientes. Em 2005, Goel et al. verificaram, por análises clínicas e radiográficas, a formação óssea em 75% dos pacientes que apresentavam deformidades e fraturas ósseas e que foram tratados com injeções únicas ou repetidas de células. A formação óssea foi constatada, em média, 14 semanas após a primeira injeção de células. Resultados promissores foram obtidos por Hernigou et al. em estudos realizados em 2002 e 2005 para tratamento, respectivamente, de osteonecrose e de fraturas em ossos longos, em que foram utilizadas injeções locais de concentrado de células aspiradas da medula óssea dos próprios pacientes. Gangji et al. (2004) e Wang et al. (2010) também obtiveram sucesso na utilização deste método no tratamento de casos de osteonecrose.

Apesar da injeção local ser o método mais comum de utilização de CTMs, injeções sistêmicas também têm sido utilizadas no tratamento de defeitos ósseos e de doenças como osteoporose e osteogênese imperfeita, com resultados promissores (Huang et al., 2015). A partir de 1999, Horwitz et al. conduziram vários estudos com crianças acometidas por osteogênese imperfeita, que é uma desordem genética geralmente causada por mutações nos genes COL1A1 ou COL1A2. As manifestações clínicas dessa anomalia envolvem quadros de osteopenia, múltiplas fraturas, severas deformidades ósseas e retardo no crescimento. Todas as crianças tratadas com injeções sistêmicas de CTMs apresentaram aumento na densidade mineral óssea, redução na frequência de fraturas e aumento na taxa de crescimento ósseo (Horwitz et al., 1999; 2001; 2002).

Para utilização terapêutica, as CTMs podem ser obtidas dos próprios indivíduos em que serão transplantadas, como também de outros doadores (Hernigou et al., 2005; Horwitz et al., 2002). As CTMs podem ainda ser expandidas em laboratório através do cultivo em meio de crescimento para se obter um maior número de células e, até mesmo, em meio indutor de diferenciação, antes de serem transplantadas (Horwitz et al. 2002; Kim et al., 2009). Kim et al., em 2009, realizaram um estudo com 64 pacientes acometidos por fraturas nos ossos longos, em que as células foram coletadas da medula óssea dos próprios pacientes e foram cultivadas em laboratório em meio indutor de diferenciação osteoblástica. As células diferenciadas foram injetadas diretamente nos locais de fratura e os resultados mostraram que houve significativa aceleração na formação óssea, sem reações adversas específicas, o que demonstra que o tratamento foi seguro e eficiente.

Além da capacidade de diferenciação osteoblástica (Owen, 1988; Jaiswal, et al., 1997), as CTMs apresentam outras propriedades que as tornam candidatas promissoras para uso em estratégias de terapia celular (Da Silva Meirelles et al., 2009; Murphy et al., 2013; Oryan

et al., 2017). As CTMs são capazes de migrar para sítios de lesão e, uma vez alojadas, são capazes de recrutar outras células osteoprogenitoras através de mecanismos parácrinos (Taguchi et al., 2005). Diversos estudos demonstraram ainda que as CTMs apresentam efeitos imunomodulatórios e imunossupressores (Krampera et al., 2013; Montespan et al., 2014; Haddad et al., 2014; Oryan et al., 2016), atividade angiogênica (Kachgal et al., 2011; Smadja et al., 2012; Manieri et al., 2015) e efeito anti-apoptótico (Togel et al., 2007). As CTMs atuam direta e indiretamente sobre as células inflamatórias, resultando na diminuição da produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , e no aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Asami et al., 2013). As CTMs atuam ainda sobre as células do sistema imune, aumentando a tolerância do organismo a células transplantadas oriundas de outros indivíduos (Kode et al., 2009; Najar et al., 2010). Essas propriedades angiogênicas e imunoregulatórias das CTMs, além de favorecer a osteogênese, tem tornado possível a utilização dessas células em estudos clínicos realizados para tratamento de injúrias vasculares e de doenças inflamatórias e autoimunes com resultados promissores (Le Blanc et al., 2004; Ra et al., 2011; Sharma et al., 2014; Molendijk et al., 2015; Saad et al., 2017). Dessa forma, as interações que as CTMs estabelecem com as células pelo contato direto e indireto, pela secreção de citocinas e fatores solúveis, alteram o microambiente tornando-o favorável a regeneração tecidual (Horwitz et al., 2006; Caplan, 2007; Oryan et al., 2017).

No entanto, estudos mostram que as CTMs constituem populações heterogêneas de células, cujas características podem variar conforme o tecido de origem (Chamberlain et al., 2007; Da Silva Meirelles et al., 2006; Pevsner-Fischer et al. 2011; Strioga et al., 2012). As CTMs foram primeiramente isoladas da medula óssea, mas podem ser obtidas de diversas outras fontes como tecido adiposo, cordão umbilical, fluido amniótico, líquido sinovial, periósteo, músculo, tendão, circulação periférica, pele e tecidos dentais (Friedenstein et al., 1966; Zvaifler et al., 2000; Gronthos et al., 2001; Cao et al., 2003; De Bari et al., 2001; Fukumoto et al., 2003; Belicchi et al., 2004; Lee et al., 2004; Tsai et al., 2004; Miura et al., 2003). A medula óssea ainda tem sido considerada a principal fonte de células, pois, além do sucesso no isolamento, as CTMs obtidas da medula óssea (CTMs-MO) apresentam considerável potencial de proliferação e diferenciação celular (Friedenstein, 1987; Rebelato et al., 2008). No entanto, o procedimento para obtenção das células é altamente invasivo e a quantidade de células obtidas é baixa. As CTMs estão presentes na medula óssea numa proporção de 0,01 a 0,001% em relação às demais células nucleadas, cuja quantidade declina com o avanço da idade. (Mueller et al., 2001, Stenderup et al., 2003; Peng et al., 2008). Como alternativa a essas limitações, o

tecido adiposo tem se tornado uma fonte viável e atrativa de células, pois as CTMs isoladas do tecido adiposo (CTMs-TA) também podem ser isoladas com eficiência, através de um procedimento menos invasivo que permite a obtenção de uma quantidade maior de células. (Zuk et al., 2001; 2002; Gimble et al., 2007; Mizuno et al., 2012; Harasymiak-Krzyzanowska et al. 2013; Ciuffi et al., 2017). Além disso, as CTMs-TA apresentam alta taxa proliferativa e podem ser cultivadas e mantidas em meio de cultura por períodos mais longos, pois estudos indicam que essas células são geneticamente mais estáveis e apresentam menor índice de senescência quando comparadas com as CTMs-MO (Kern et al., 2006; Strioga et al., 2012; Mizuno et al., 2012; Harasymiak-Krzyzanowska et al., 2013; Ciuffi et al., 2017). O potencial regenerativo das CTMs-TA também tem sido investigado e aplicado em diversos estudos clínicos no campo da medicina regenerativa (Fang et al., 2006; Gimble et al., 2007; Kulakov et al., 2008; Ra et al., 2011; Jung et al., 2015; Henry et al. 2017; Saad et al., 2017; Song et al., 2017; 2018).

Análises comparativas das características das CTMs obtidas de fontes distintas, como da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA), têm mostrado resultados controversos, especialmente no que se refere ao potencial de diferenciação osteoblástica, à atividade angiogênica e à imunomodulação, o que pode ser explicado, em parte, pelas diferenças relativas às espécies doadoras de células, aos protocolos de cultivo e às metodologias utilizadas nos estudos (Sakaguchi et al., 2005; Wagner et al., 2005; Izadpanah et al., 2006; Kern et al., 2006; Peroni et al., 2008; Noel et al., 2008; Peng et al., 2008; Rebelatto et al., 2008; Jansen et al., 2010; Dmitrieva et al., 2012; Strioga et al., 2012; Melief et al., 2013; Amable et al., 2014; Hao et al., 2014; Kasim et al., 2015; Secunda et al., 2015; Abuna et al., 2016; Du et al., 2016; Heo et al., 2016; Roson-Burgo et al., 2016; Brennan et al., 2017; Cho et al., 2017; Im G-I, 2017).

Um dos avanços metodológicos e científicos para análise das características das células, é a tecnologia do Microarray, que representa uma técnica promissora no campo da medicina, pois constitui uma ferramenta útil no prognóstico, diagnóstico e tratamento de doenças (Guindalini et al., 2007). A tecnologia do Microarray permite a investigação das características moleculares de células em diferentes condições fisiológicas, a detecção de variações nos padrões de expressão gênica que possam estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças e a análise do comportamento molecular de células submetidas à administração de substâncias terapêuticas e à diversas opções de tratamentos (Prado et al., 2008; Inaoka et al., 2015; Zhuang et al., 2016; Kaneto et al., 2017; Denisov et al., 2017; Gao et al., 2018; Kayabasi

et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2018). O Microarray também constitui um importante instrumento de pesquisa para a identificação e a caracterização de diferentes tipos celulares (Silva et al., 2003; Da Silva Meirelles et al., 2016) e ainda possibilita a comparação dos perfis de expressão gênica de células provenientes de tecidos diferentes ou em diferentes estágios de diferenciação (Wagner et al., 2005; Kulterer et al., 2007).

Assim, tendo em vista que as CTMs obtidas de fontes distintas podem exibir diferenças a nível molecular, que ainda não estão esclarecidas pela literatura e que poderiam influenciar o potencial regenerativo dessas células, este trabalho teve por propósito investigar as características moleculares de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA), bem como de osteoblastos diferenciados a partir dessas células (OBs-MO e OBs-TA, respectivamente), por meio da avaliação dos perfis de expressão gênica em larga escala, utilizando a tecnologia de microarray, que poderiam contribuir para a adequada seleção de uma população celular específica que melhor favoreça a regeneração óssea em estratégias de terapia celular.

2 Proposição

O presente trabalho teve por objetivo comparar os perfis de expressão gênica em larga escala, avaliados por microarray, de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) de ratos, e de osteoblastos diferenciados a partir dessas células (OBs-MO e OBs-TA, respectivamente).

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 17/08/2016, Processo nº 2016.1.504.58.8 (Anexo A).

As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) foram isoladas de 6 ratos machos da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 150 g. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica, totalizando a utilização de 12 animais.

3.2 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais

Os procedimentos para obtenção e cultura das células foram realizados no Biotério e no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2.1 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

Para obtenção das células-tronco mesenquimais, os ratos foram submetidos à eutanásia por inalação de Isoflurano® (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, RJ, Brasil). Os fêmures foram retirados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e, a medula óssea, extraída por irrigação com meio de crescimento (condição não indutora de diferenciação celular) contendo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). As células da medula óssea foram cultivadas em meio de crescimento, em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA), até a subconfluência para permitir a seleção das células-tronco mesenquimais por aderência ao poliestireno. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

3.2.2 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As células-tronco mesenquimais foram obtidas do tecido adiposo da região inguinal dos mesmos ratos utilizados para obtenção de células da medula óssea. Após lavagem com PBS (Invitrogen), o tecido adiposo foi seccionado em fragmentos de aproximadamente 3 mm³ e foi submetido à digestão enzimática em 20 mL de solução de colagenase II 0,075% (Gibco-Life Technologies) a 37°C, sob agitação constante por 40 minutos. Em seguida, foi adicionado igual volume de meio de crescimento para neutralizar a ação enzimática. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos e, o tecido adiposo flutuante, removido. O pellet foi ressuspensionado em meio de crescimento e as CTMs-TA foram cultivadas como descrito para as CTMs-MO.

3.3 Manutenção das características de células-tronco mesenquimais e diferenciação osteoblástica

Ao atingir a subconfluência, parte das culturas de CTMs-MO e CTMs-TA foram tripsinizadas e o RNA total das amostras foi isolado utilizando o kit mirVanaTM (miRNA Isolation Kit, Invitrogen, Termo Fisher Scientific), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. Em seguida, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80°C.

As demais culturas de CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas por 10 dias em meio osteogênico, composto por meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich), para induzir a diferenciação osteoblástica. Após esse período, as culturas de OBs-MO e OBs-TA foram tripsinizadas e o RNA total foi isolado e armazenado conforme descrito para as CTMs.

3.4 Quantificação e avaliação da integridade do RNA total

A quantificação e a avaliação da pureza das amostras de RNA total foram realizadas utilizando o NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, United Kingdom). A integridade das amostras de RNA total foi analisada por meio do sistema de eletroforese microfluídica utilizando o Agilent RNA 6000 Nano Kit e o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para isso, as amostras de RNA foram diluídas e, de cada amostra, foram utilizados 200 ng de RNA total para a amplificação do mRNA. Antes do preparo do chip, os reagentes do kit foram deixados a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, 1 µL do RNA 6000 Nano Dye foi pipetado em uma alíquota de 65 µL de RNA 600 Nano Gel. Essa mistura foi vortexada por 10 segundos e centrifugada a 13.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o RNA 6000 Nano Chip foi inserido no priming station e 9 µL da mistura gel/dye foram pipetados no poço do chip indicado pela letra “G”. A mistura gel/dye foi distribuída por todo chip com o auxílio de uma seringa acoplada ao priming station. Após esse procedimento, 9 µL da mistura gel/dye foram pipetados nos demais poços do chip indicados com a letra “G”. Na sequência, 1 µL do marcador (ladder) foi pipetado no respectivo poço e 5 µL do RNA 6000 Nano Marker foram pipetados nos poços das amostras e no poço do ladder. Por fim, foi pipetado 1 µL de cada amostra nos respectivos poços, numerados de 1 a 12. Em seguida, o chip foi agitado horizontalmente no vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, China) por 1 minuto, a 2200 rpm. Imediatamente após, o chip foi inserido no aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e a leitura foi realizada pelo software da Agilent 2100 Expert. O software calcula o RNA Integrity Number (RIN), que varia de 0 a 10, conforme a qualidade da

integridade do RNA. Após a avaliação da integridade do RNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises por microarray.

3.5 Oligo Microarray

A análise genômica foi realizada no Laboratório de Imunogenética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram utilizados microarrays Agilent 4x44k, contendo 44.000 oligonucleotídeos, sintetizados e fixados na superfície das lâminas através do sistema de impressão (SurePrint), utilizando sequências de RNA mensageiro obtidas de arquivos disponíveis em banco de dados. A marcação e a amplificação do RNA foram realizadas seguindo as especificações do One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol da Agilent.

3.5.1 Preparo das amostras

Primeiramente, foi realizado o preparo e a diluição do Spike Mix. O Spike Mix foi vortexado, aquecido a 37°C por 5 minutos, novamente vortexado e centrifugado por alguns segundos. Após esses procedimentos, foram realizadas 3 diluições seriadas do Spike Mix (1:20; 1:25 e 1:10), conforme o descrito no protocolo da Agilent para uma massa de RNA total de 200 ng. Após as diluições, 200 ng de RNA total em um volume final de 1,5 µL total foram colocados em tubos de 1,5 mL. Em cada tubo, foram adicionados 2 µL de Spike Mix diluído, perfazendo um volume final de 3,5 µL. Em seguida, foram adicionados 1,8 µL de T7 Primer Mix diluído em cada tubo de amostra, os quais foram incubadas em banho-maria, a 65°C, por 10 minutos. Após serem retiradas do banho, as amostras foram colocadas no gelo por 5 minutos.

3.5.2 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, foi realizado o pré-aquecimento do 5x First Strand Buffer por 4 minutos, a 80°C, seguida da agitação em vortex e de breve centrifugação. O cDNA Master Mix foi preparado pela adição de 30 µL de 5x First Strand Buffer, 15 µL de 0,1 M de DTT, 7,5 µL de 10 mM de dNTP Mix e 18 µL de Affinity Script RNase Block Mix. O volume de cada reagente foi calculado com base no número de reações, conforme as proporções especificadas pelo protocolo da Agilent. Após breve centrifugação, 4,7 µL do cDNA Master Mix foram adicionados em cada tubo de amostra, os quais foram incubados em banho-maria, a 40°C, por 2 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para o banho-maria, a 70°C, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas brevemente.

3.5.3 Síntese, amplificação e marcação do cRNA

O preparo do Transcription Master Mix para síntese e amplificação do cRNA foi realizado pela adição de 11,25 μL de Nuclease-Free Water, 48 μL de 5x Transcription Buffer, 9 μL de 0,1 M de DTT, 15 μL de NTP Mix, 3,15 μL de T7 RNA Polymerase Blend e 3,6 μL de Cyanine 3-CTP. O volume de cada reagente foi calculado com base no número de reações, conforme as proporções especificadas pelo protocolo da Agilent. Após breve centrifugação, 6 μL do Transcription Master Mix foram adicionados em cada tubo de amostra, os quais foram incubados em banho-maria, a 40°C, por 2 horas.

3.5.4 Purificação do cRNA

Para purificação do cRNA foi utilizado o Illustra™ RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences). Primeiramente, foram adicionados 56 μL do tampão RA1 em cada tubo da amostra, seguida da adição de 56 μL de álcool 100%. Em seguida, as amostras foram transferidas para as colunas do kit Illustra™ e centrifugadas a 8.000 rpm, a 4°C, por 30 segundos. Após a centrifugação, os tubos coletores foram descartados e as colunas foram transferidas para tubos novos. Em seguida, foi realizado uma nova lavagem, adicionando tampão RA3 em cada coluna, seguida de centrifugação a 11.000 rpm, a 4°C, por 1 minuto. O líquido do tubo coletor foi descartado e uma nova lavagem da coluna com tampão RA3 foi realizada, seguida de centrifugação a 11.000 rpm, a 4°C, por 3 minutos.

Para eluição do cRNA, foram adicionados 40 μL de água livre de nucleases em cada coluna, seguida de centrifugação a 11.000 rpm, a 4°C, por 1 minuto.

3.5.5 Quantificação do cRNA

A quantificação do cRNA (ng/ μL) de cada amostra foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-VIS (NanoDrop Technologies). Foram obtidas ainda a concentração de cianina 3 (pmol/ μL), necessárias para avaliação da eficácia da incorporação desse fluorocromo no cRNA.

3.5.6 Hibridização

Em cada tubo de amostra contendo 1,65 μg de cRNA, foram adicionados 11 μL de 10x Gene Expression Blocking Agent e 2,2 μL de 25x Fragmentation Buffer. Em seguida, as amostras foram incubadas a 60°C, por 30 minutos, para fragmentação do cRNA. Decorridos os 30 minutos, as amostras foram colocadas no gelo por 1 minuto. Logo após, foram adicionados 55 μL de Hi-RPM Hybridization Buffer em cada tubo de amostra. Para o processo de

hibridização, foram colocados 100 µL de cada amostra em cada campo da lâmina. As lâminas de microarray foram levadas ao forno de hibridização, onde permaneceram em rotação de 10 rpm, por 17 horas, a 65°C.

3.5.7 Lavagem das lâminas de microarray

Após o processo de hibridização, as lâminas foram lavadas por 1 minuto em GE Wash Buffer 1 (contendo 0,005% Triton X-102), à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 1 minuto em GE Wash Buffer 2 (contendo 0,005% Triton X-102), a 37°C. Na sequência, as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos e em solução de Stabilization and Drying por 30 segundos, à temperatura ambiente. A utilização do Stabilization and Drying tem por finalidade prevenir a degradação da cianina 3 pelo ozônio. As soluções utilizadas nessas etapas permaneceram sob agitação constante durante todo o procedimento.

3.5.8 Escaneamento e extração dos dados

Após os procedimentos de lavagens, as lâminas foram imediatamente escaneadas utilizando o DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos utilizando o Agilent Feature Extraction Software.

3.5.9 Análise dos dados

A análise da modulação dos genes diferencialmente expressos entre cada grupo de comparação foi realizada pelo software GeneSpring 14.8 GX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Os dados extraídos do Agilent Feature Extraction Software foram inseridos no software e normalizados por percentil 75%. Os perfis de expressão gênica dos grupos experimentais foram comparados considerando os parâmetros relacionados ao tecido de origem (medula óssea e tecido adiposo) e à diferenciação celular (células indiferenciadas e diferenciadas). A análise estatística dos dados em cada grupo de comparação foi realizada utilizando o Test-T não pareado, adotando valor de $p \leq 0.05$. Para análise da modulação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos, foi adotado um fold-change ≥ 2.0 . O agrupamento hierárquico dos dados (clustering) foi realizado utilizando a medida de distância euclidiana (centroide) para expressar a similaridade entre os grupos.

A análise funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizada pela database DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (<https://david.ncifcrf.gov>). Os genes diferencialmente expressos entre cada grupo de

comparação foram inseridos na plataforma e agrupados por processo biológico (Functional Annotation Clustering - Gene Ontology), adotando um valor de $p \leq 0.05$.

3.5.10 Confirmação dos dados por PCR em tempo real

Os dados obtidos pelo microarray foram confirmados por PCR em tempo real. Foram avaliados os genes *Gdf10*, *Alpl*, *Ibsp*, *Dlx5*, *Mgp* e *Igf2*, relacionados com o processo de osteogênese. O PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema SYBR Green e o aparelho Step One Plus (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Neste procedimento foram utilizados 7 µL do reagente SYBR Green Master Mix (Life Technologies), que contém o fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência e, além dos demais componentes de tampão, foram utilizado 2,5 µL da solução de DNAC, 2,5 µL de água Milli-Q tratada com DEPC e 0,5 µL da solução contendo cada primer com as concentrações adequadas.

A reação de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, do inglês cycle threshold). O gene de referência *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizado para a normalização dos dados. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001). Os primers foram desenhados utilizando o Programa Primer-Blast, sendo a sequência dos mesmos descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para validação do microarray

Genes	Sequências sense e anti-sense	bp
Gdf10	GCAGACATCGGGTGAATGAA GACTGCTTTAATCTTGCTCTGCAT	136
Alp	TACTGCTGATCACTCCCACG ACCGTCCACCACCTTGTAAC	152
Ibsp	GACTGCTTTAATCTTGCTCTGCAT GTAGCGTGGCCGGTACTTAAA	124
Dlx5	CAGAAGACTCAGTACCTCGCC TACACGCCATAGGGTTCGCT	178
Mgp	AGAGATGGCACGCTAAAGCC CTGCCTGAAGTAGCGGTTGTA	152

Genes	Sequências sense e anti-sense	bp
Igf2	GCTTGTTGACACGCTTCAGT GGGGTGGCACAGTATGTCTC	153
Gapdh	GACAACTTTGGCATCGTGGAA AGGGATGATGTTCTGGGCTG	129

Gdf10 (growth differentiation fator 10); Alp (alkaline phosphatase); Mgp (matrix gla protein); Ibsp (integrin-binding sialoprotein); Dlx5 (distal-less homeobox 5); Igf2 (insulin-like growth fator 2); Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Fonte: Programa Primer-Blast.

4 Resultados

4.1 Avaliação da integridade do RNA total

A qualidade do RNA total de cada amostra foi avaliada pela integridade das bandas de RNAr 28S, RNAr 18S e RNAr 5S, obtidas por eletroforese microfluídica, e pelo valor de RIN (RNA Integrity Number), calculado pela densitometria do RNA. Os dados da eletroforese e da densitometria foram obtidos pelo Agilent 2100 Expert Software e os resultados mostraram que todas as amostras de RNA total apresentaram-se íntegras, com valores de RIN variando de 9 a 10.

4.2 Análises do mRNAs diferencialmente expressos

A modulação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos é apresentada na Figura 1, pelo heat map, no qual os grupos e os genes apresentam-se organizados em agrupamentos hierárquicos por dendrogramas, de acordo com a similaridade no padrão de expressão gênica. As linhas do dendrograma estão ligadas segundo o grau de similaridade entre os grupos (cluster) e as cores mostram as diferenças na modulação da expressão gênica (fold-change ≥ 2.0). Os dados são apresentados como média da duplicata experimental, considerando os parâmetros analisados quanto à origem e à diferenciação celular.

O agrupamento hierárquico mostra que as CTMs de ambas as fontes estão agrupadas no mesmo “cluster” pela similaridade nos perfis de expressão gênica. Os OBs-TA apresentaram maior similaridade de expressão gênica com as CTMs, pela menor distância com o “cluster” dessas células. Os OBs-MO apresentaram uma maior distância em relação às CTMs, o que se traduz em maiores diferenças em seu perfil de expressão gênica.

Figura 1 – Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos nas amostras de CTMs-MO (A), CTMs-TA (B), OBs-TA (C) e OBs-MO (D). O vermelho representa indução, o azul representa repressão e, o amarelo, não modulação. Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Quanto ao parâmetro tecido de origem, as análises dos perfis de expressão gênica das CTMs-TA em relação às CTMs-MO apresentaram 1202 genes induzidos e 1029 genes reprimidos (arquivo completo disponível em CD-ROM – Anexo B). Os genes mais modulados são apresentados nas Tabelas 2 e 3 (induzidos e reprimidos, respectivamente).

Tabela 2 – Genes induzidos no grupo CTMs-TA em relação ao grupo CTMs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
Wfdc18	WAP four-disulfide core domain 18	+ 548,02
Dpt	dermatopontin	+ 240,4
Efemp1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	+ 143,37
Gsc	goosecoid homeobox	+ 108,19
Ccl11	chemokine (C-C motif) ligand 11	+ 107,71
Hoxb7	homeo box B7	+ 99,03
En1	PREDICTED: engrailed homeobox 1	+ 92,24
Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	+ 88,02
Gdf10	growth differentiation factor 10	+ 86,46
Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	+ 77,05
C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	+ 74,46
C4a	complement component 4A (Rodgers blood group)	+ 69,33
Dpep1	dipeptidase 1 (renal)	+ 61,47
Irx1	iroquois homeobox 1	+ 60,83
Il33	interleukin 33	+ 55,76
Figf	c-fos induced growth factor	+ 51,99
Sult1a1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A,	+ 51,24
Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2	+ 51,03
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	+ 50,02
Cyb561	cytochrome b-561	+ 48,46

Fonte: GeneSpring 14.8 GX.

Tabela 3 – Genes reprimidos no grupo CTMs-TA em relação ao grupo CTMs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
Ms4a4a	PREDICTED: membrane-spanning 4-domains, 4A	- 322,24
RGD1559	similar to immunoglobulin superfamily, member 7	- 268,69
LOC6900	PREDICTED: killer cell lectin-like receptor 7-like	- 51,82
Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member A3	- 248,06
C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	- 241,78
Ms4a7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	- 218,37
Ibsp	integrin-binding sialoprotein	- 214,95

Gene	Descrição	Fold-Change
Fcrl2	Fc receptor-like 2	- 212,38
Igsf6	immunoglobulin superfamily, member 6	- 202,82
Tnn	tenascin N	- 188,97
Gcgr	glucagon receptor	- 177,01
Fcn1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	- 169,33
C1qa	complement component 1, q subcomponent, A chain	- 167,11
Dlx5	distal-less homeobox 5	- 151,06
Clec4a1	C-type lectin domain family 4, member A1	- 150,9
Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	- 149,54
Pf4	platelet factor 4	- 146,53
Il1b	interleukin 1 beta	- 137,7
Ctss	cathepsin S	- 133,36
Slamf9	SLAM family member 9	- 132,93

Fonte: GeneSpring 14.8 GX.

Ainda considerando o tecido de origem, as análises dos perfis de expressão gênica de OBs-TA em relação aos OBs-MO apresentaram 3584 genes induzidos e 4376 genes reprimidos (arquivo completo disponível em CD-ROM – Anexo B). Os genes mais modulados são apresentados nas Tabelas 4 e 5 (induzidos e reprimidos, respectivamente).

Tabela 4 – Genes induzidos no grupo OBs-TA em relação ao grupo OBs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
Otud1	PREDICTED: OTU domain containing 1	+ 127,4
Ripply1	PREDICTED: ripply transcriptional repressor 1	+ 125,62
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	+ 116,45
Aqp3	aquaporin 3	+ 101,47
Tpt1	tumor protein, translationally-controlled 1	+ 92,79
Tmeff2	transmembrane protein with EGF-like - two follistatin 2	+ 88,65
Rapgef5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	+ 86,25
Lpl	lipoprotein lipase	+ 82,46
RGD156	PREDICTED: translationally-controlled tumor protein-like	+ 72,07
Irx1	iroquois homeobox 1	+ 66,15
Spry2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	+ 59,89
Hoxb7	homeo box B7	+ 58,24
Sf3b5	splicing factor 3b, subunit 5	+ 52,73
Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	+ 50,24
Osr2	odd-skipped related transcription factor 2	+ 49,28
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	+ 47,12
Sptbn1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	+ 43,86

Gene	Descrição	Fold-Change
LOC1025	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like	+ 43,62
Galnt16	N-acetylgalactosaminyltransferase 16	+ 42,943

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Tabela 5 – Genes reprimidos no grupo OBs-TA em relação ao grupo OBs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
Podnl1	PREDICTED: podocan-like 1	- 295,06
Gprc5c	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	- 216,97
Slamf9	SLAM family member 9	- 164,73
Ptx3	pentraxin 3, long	- 138,23
Il1b	interleukin 1 beta	- 130,15
Mepe	matrix extracellular phosphoglycoprotein	- 130,12
Rpl39l	ribosomal protein L39-like	- 126,85
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	- 125,08
Clec12a	C-type lectin domain family 12, member A	- 96
Lbp	lipopolysaccharide binding protein	- 95,21
Aif1	allograft inflammatory factor 1	- 93,33
Dlx5	distal-less homeobox 5	- 92,52
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	- 86,4
P2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	- 83,17
Mlana	melan-A	- 83,14
Cfh	complement factor H	- 76
Ibsp	integrin-binding sialoprotein	- 74,6
Aif1	allograft inflammatory factor 1	- 70,36
Tnn	tenascin N	- 70,03
Upk1b	Uroplakin 1B	- 68,68

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Quanto à diferenciação celular, as análises dos perfis de expressão gênica de OBs-MO em relação a CTMs-MO apresentaram 4296 genes induzidos e 3478 genes reprimidos (arquivo completo disponível em CD-ROM – Anexo B).

Os genes mais modulados são apresentados nas Tabelas 6 e 7 (induzidos e reprimidos, respectivamente).

Tabela 6 – Genes induzidos no grupo OBs-MO em relação ao grupo CTMs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
Sult1a1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring 1	+ 1325,05
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	+ 517,49
Akr1c1	aldo-keto reductase family 1, member C-like	+ 488,48
Mt1a	metallothionein 1a	+ 401,27
Prom1	prominin 1	+ 400,79
Gpr64	G protein-coupled receptor 64	+ 356,12
Retn	resistin	+ 331,69
LOC10036	PREDICTED: hypothetical protein LOC100362769	+ 248,8
Acer2	alkaline ceramidase 2	+ 243,31
S100a8	S100 calcium binding protein A8	+ 233,49
Mt2A	metallothionein 2A	+ 190,54
Cfb	complement factor B	+ 185,21
Plac8	placenta-specific 8	+ 174,31
Klf15	Kruppel-like factor 15	+ 170,14
Igf2	insulin-like growth factor 2	+ 163,61
Lcn2	lipocalin 2	+ 163,26
Prom1	prominin 1	+ 162,09
Aox1	aldehyde oxidase 1	+ 157,95
Mgp	matrix Gla protein	+ 151,41
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibition 1C	+ 145,98

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Tabela 7 – Genes reprimidos no grupo OBs-MO em relação ao grupo CTMs-MO

Gene	Descrição	Fold-Change
LOC31092	hypothetical protein	- 974,61
Fcrl2	Fc receptor-like 2	- 143,19
LOC68479	PREDICTED: histone H2B type 1-C/E/G-like	- 132,15
Tnc	tenascin C	- 110,71
Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	- 79,96
Ect2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	- 79,86
Ube2c	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	- 77,54
Nuf2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component	- 77,17
Foxe1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	- 76,25
Hist1h1b	histone cluster 1, H1b	- 67,16
Mmp12	matrix metalloproteinase 12	- 64,15
Tpt1	tumor protein, translationally-controlled 1	- 59,96

Gene	Descrição	Fold-Change
Ccnb2	cyclin B2	- 57,66
LOC10254	PREDICTED: histone H4-like	- 57,16
Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha	- 56,69
Sf3b5	splicing factor 3b, subunit 5	- 54,73
RGD1565	PREDICTED: translationally-controlled tumor protein	- 52,81
Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein	- 52,77
Has2	hyaluronan synthase 2	- 50,58
Fxyd6	Fxyd domain containing ion transport regulator 6	- 50,58

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Para o parâmetro de diferenciação celular, as análises dos perfis de expressão gênica de OBs-TA em relação a CTMs-TA apresentaram 1793 genes induzidos e 2030 genes reprimidos (arquivo completo disponível em CD-ROM – Anexo B). Os genes mais modulados são apresentados nas Tabelas 8 e 9 (induzidos e reprimidos, respectivamente).

Tabela 8 – Genes induzidos no grupo OBs-TA em relação ao grupo CTMs-TA

Gene	Descrição	Fold-Change
Agt	angiotensinogen	+ 1482,72
Gcgr	glucagon receptor	+ 1185,95
Acer2	alkaline ceramidase 2	+ 550,35
Slc43a3	solute carrier family 43, member 3	+ 397,11
Atpla2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	+ 351,09
Krt23	keratin 23 (histone deacetylase inducible)	+ 333,98
Tf	transferrin	+ 333,03
RGD1565	similar to fatty acid translocase/CD36	+ 318,78
Cd36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	+ 290,52
Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, member 3N	+ 259,31
Fmo3	flavin containing monooxygenase 3	+ 230,66
Rapgef5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	+ 224,93
Fmo1	flavin containing monooxygenase 1	+ 217,8
Fmo2	flavin containing monooxygenase 2	+ 212,73
Scin	scinderin	+ 211,99
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	+ 210,94
Ripply1	PREDICTED: ripply transcriptional repressor 1	+ 182,67
Flt3	fms-related tyrosine kinase 3	+ 181,1
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	+ 165,67
Cd36	Cd 36 molecule	+ 165,43

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

Tabela 9 – Genes reprimidos no grupo OBs-TA em relação ao grupo CTMs-TA

Gene	Descrição	Fold-Change
Ptx3	pentraxin 3, long	- 419,33
Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	- 322,62
Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10	- 236,53
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	- 152,05
Cthrc1	collagen triple helix repeat containing 1	- 143,45
Il1rl1	interleukin 1 receptor-like 1	- 98,85
Artn	artemin	- 97,66
Fbn2	fibrillin 2	- 90,41
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1	- 83,42
Lrrc15	leucine rich repeat containing 15	- 79,23
Dact1	PREDICTED: dishevelled-binding antagonist beta-catenin 1	- 78,59
Lum	lumican	- 76,39
Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	- 71,04
Ccna2	cyclin A2	- 68,23
Gprc5a	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	- 67,86
Adh7	alcohol dehydrogenase 7	- 59,6
Cenpw	centromere protein W	- 56,74
Fam64a	family with sequence similarity 64, member A	- 55,14
LOC68	PREDICTED: similar to centromere autoantigen H 512]	- 53,83

Fonte: GeneSpring 14.8 GX Software.

A caracterização funcional dos genes mais modulados, considerando os processos biológicos de interesse, são apresentados em cada grupo de comparação nas Tabelas 10 a 13.

Apesar das similaridades encontradas nos perfis de expressão gênica das CTMs, as CTMs-TA apresentaram, em relação às CTMs-MO, uma sobre-expressão de genes relacionados aos processos de regulação da resposta inflamatória e angiogênese e uma repressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica e osteogênese (Tabela 10).

Tabela 10 – Caracterização funcional dos genes de interesse diferencialmente expressos no grupo CTMs-TA vs CTMs-MO

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Wfdc18	Resposta inflamatória	+ 548,02
Gsc	Angiogênese	+ 108,19
Ccl11	Angiogênese	+ 107,71
Gdf10	Diferenciação adipogênica/Diferenciação osteoblástica	+ 86,46
Sfrp2	Angiogênese/Diferenciação adipogênica e osteoblástica	+ 51,03

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Cdkn1c	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 32,51
Gpc3	Mineralização óssea	+ 32,07
Osr2	Mineralização óssea/Proliferação de osteoblastos	+ 27,93
Lrrc17	Proliferação de osteoblastos	+ 25,92
Nox1	Angiogênese	+ 22,42
Nov	Angiogênese/Resposta inflamatória	+ 18,32
Npr3	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 18,12
Adipoq	Diferenciação adipogênica/Resposta inflamatória	+ 16,87
Bmpr1b	Mineralização/Resposta inflamatória/Diferenciação osteoblástica	+ 16,73
Edn1	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 16,00
Mgp	Proliferação de CTMs	+ 11,17
Fbn2	Mineralização óssea/Diferenciação osteoblástica	+ 11,06
Adm	Angiogênese	+ 10,43
Ibsp	Mineralização óssea/Ossificação/Diferenciação osteoblástica	- 214,95
Dlx5	Ossificação endocondral/Ossificação/Diferenciação osteoblástica	- 151,06
Alpl	Ossificação endocondral/Diferenciação osteoblástica	- 149,54
Il1b	Angiogênese	- 137,70
Mmp13	Ossif. endocondral/Mineralização/Diferenciação osteoblástica	- 123,11
Aif1	Resposta inflamatória	- 106,80
Fcer1g	Resposta imune/Resposta inflamatória	- 105,23
Inpp5d	Resposta imune	- 98,57
Il18	Angiogênese/Resposta inflamatória/Diferenciação osteoblástica	- 78,75
S1pr1	Angiogênese	- 56,73
Ccr5	Resposta inflamatória	- 55,92
Itgb2	Angiogênese	- 54,06
C5ar1	Angiogênese	- 53,50
Lrg1	Angiogênese	- 52,13
Wnt10b	Diferenciação de condrócito/Mineralização óssea	- 47,74
Nckap11	Resposta inflamatória	- 42,75
Mepe	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 40,72
Syk	Angiogênese	- 37,04
Ccl6	Resposta inflamatória	- 32,64
Foxc1	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 23,52
Tnf	Resposta inflamatória	- 23,33
Ptger2	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 22,45
Cybb	Angiogênese	- 21,35
Bglap	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 18,92
Foxc2	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 17,67
Hoxa11	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 17,01

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Srgn	Desenvolvimento de tecido mineralizado	- 15,66
Gpnmmb	Diferenciação osteoblástica/Mineralização óssea	- 15,09
Notch1	Angiogênese	- 14,83
Fcgr2b	Resposta imune	- 13,3
Lbp	Resposta imune	- 12,89
Cd14	Resposta inflamatória	- 12,73
Prkcb	Angiogênese	- 12,53
Ccl3	Resposta inflamatória/Diferenciação osteoblástica	- 12,31
Pecam1	Angiogênese	- 11,14
Hapln2	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 10,40
Spns2	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 10,15

Fontes: GeneSpring 14.8 GX Software/DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (<https://david.ncifcrf.gov>).

Os OBs-TA apresentaram, em relação aos OBs-MO, uma sobre-expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica, angiogênese e proliferação de CTMs e uma repressão de genes relacionados aos processos de resposta inflamatória, desenvolvimento do sistema esquelético, diferenciação osteoblástica, osteogênese e condrogênese (Tabela 11).

Tabela 11 – Caracterização funcional dos genes de interesse diferencialmente expressos no grupo OBs-TA vs OBs-MO

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Aacs	Diferenciação adipogênica	+ 116,45
Egr1	Angiogênese	+ 42,13
Adipoq	Angiogênese	+ 41,03
Rhob	Angiogênese	+ 39,12
Kdr	Angiogênese	+ 36,23
Edn1	Angiogênese	+ 31,26
Anpep	Angiogênese	+ 30,49
Flna	Angiogênese	+ 12,93
Hif1a	Angiogênese	+ 12,21
Hmgb1	Proliferação de CTMs	+ 11,13
Atp5b	Angiogênese	+ 10,95
Serpine	Angiogênese	+ 10,03
Il1b	Resposta inflamatória	- 130,15
Mepe	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 130,12
Mmp13	Ossif. endocondral/Mineralização/Diferenciação osteoblástica	- 125,08
Dlx5	Ossificação endocondral/Ossificação/Diferenciação osteoblástica	- 92,52
Ibsp	Mineralização óssea/Ossificação/Diferenciação osteoblástica	- 74,60

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Igf2	Ossificação/Diferenciação osteoblástica	- 62,03
Alpl	Ossificação endocondral/Diferenciação osteoblástica	- 60,27
Il18	Resposta inflamatória/Diferenciação osteoblástica	- 47,66
Cx3cl1	Resposta inflamatória	- 30,32
Hoxa11	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 29,78
Ccr5	Resposta inflamatória	- 26,78
Cxcl2	Resposta inflamatória	- 26,63
Foxc1	Organização de fibras colágenas/Desenv. do sist. esquelético	- 26,38
Foxc2	Organização de fibras colágenas/Desenv. do sist. esquelético	- 22,24
Hapln3	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 21,11
Asxl1	Desenvolvimento ósseo	- 21,01
Lrp5	Desenvolvimento ósseo/Remodelação óssea	- 17,22
Igf1	Diferenciação osteoblástica/Desenv. do sistema esquelético	- 16,12
Bmp3	Desenvolvimento de cartilagem/Diferenciação osteoblástica	- 13,28
Ccl3	Resposta inflamatória/Diferenciação osteoblástica	- 12,16
Hexb	Desenvolvimento do sistema esquelético	- 10,66

Fontes: GeneSpring 14.8 GX Software/DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (<https://david.ncifcrf.gov>).

Os OBs-MO apresentaram, em relação às CTMs-MO, uma sobre-expressão de genes relacionados aos processos de desenvolvimento do sistema esquelético, ossificação, regulação da resposta inflamatória e organização da matriz extracelular e uma repressão de genes relacionados aos processos de diferenciação osteoblástica, angiogênese, processo regenerativo e morfogênese do osso (Tabela 12).

Tabela 12 – Caracterização funcional dos genes de interesse diferencialmente expressos no grupo OBs-MO vs CTMs-MO

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Cdkn1c	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 517,49
Igf2	Ossificação	+ 163,61
Lcn2	Resposta imune	+ 163,26
Mgp	Ossificação	+ 151,41
Agt	Angiogênese/Organização da matriz extracelular	+ 92,02
Hp	Angiogênese/Organização da matriz extrac./Difer. osteoblástica	+ 68,43
Eln	Angiogênese/Organização da matriz extracelular	+ 58,41
Nox1	Organização da matriz extracelular	+ 45,65
Epas1	Angiogênese/Resposta inflamatória	+ 28,41
Chrdl1	Ossificação	+ 26,72
Crispld2	Organização de matriz extracelular	+ 16,47

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Bcl2l1	Angiogênese/Resposta inflamatória	+ 15,42
Myog	Ossificação	+ 12,35
Cx3cl1	Resposta inflamatória	+ 10,76
Spp1	Mineralização óssea	+ 10,53
Tnc	Diferenciação osteoblástica	- 110,71
Ccl12	Angiogênese	- 79,96
Mmp12	Processo regenerativo	- 64,15
Has2	Morfogênese do osso/Vasculogênese	- 50,85
Alyref	Diferenciação osteoblástica	- 50,36
Tnn	Angiogênese/Proliferação de CTMs/Diferenciação osteoblástica	- 44,55
Ccna2	Angiogênese	- 40,72
Egr1	Angiogênese/Processo regenerativo	- 31,23
Tbx18	Proliferação de CTMs	- 30,19
Hif1a	Angiogênese	- 22,31
Rras2	Diferenciação osteoblástica	- 18,04
Cthrc1	Diferenciação osteoblástica	- 17,70
Klf5	Angiogênese	- 17,29
Shox2	Desenvolvimento de condrócito/Diferenciação osteoblástica	- 15,60
Plxnd1	Angiogênese	- 14,59
Flna	Angiogênese	- 13,89
Mrc2	Diferenciação osteoblástica	- 13,36
Cyp1b1	Angiogênese	- 12,70
Igsf10	Ossificação	- 12,35
Grem1	Angiogênese	- 12,27
Tgfb1	Angiogênese	- 11,60
Rhob	Angiogênese	- 10,93
S1pr1	Angiogênese	- 10,68

Fontes: GeneSpring 14.8 GX Software/DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (<https://david.ncifcrf.gov>).

Os OBs-TA apresentaram, em relação às CTMs-TA, uma sobre-expressão de genes relacionados aos processos de angiogênese, organização da matriz extracelular, respostas inflamatória e imune, metabolismo de lipídeos, processo regenerativo, diferenciação adipogênica e desenvolvimento do sistema esquelético e uma repressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, condrogênese e organização de fibras colágenas (Tabela 13).

Tabela 13 – Caracterização funcional dos genes de interesse diferencialmente expressos no grupo OBs-TA vs CTMs-TA

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Agt	Angiogênese/Organização extracelular/Resposta inflamatória	+ 1482,72
Cd36	Resposta celular à lipopolissacarídeo/Resposta imune	+ 290,52
Flt3	Processo regenerativo	+ 181,10
Chrdl1	Ossificação	+ 78,63
Orm1	Processo regenerativo	+ 68,44
S100a8	Resp. inflamatória/Resp. à lipopolissacarídeo/Proc. regenerativo	+ 57,78
Adipoq	Angiogênese/Diferenciação adipogênica/Resposta inflamatória	+ 54,38
Epas1	Angiogênese	+ 52,01
Stc1	Ossificação	+ 45,75
Apoe	Resposta inflamatória/Homeostase de triglicerídeos	+ 31,65
Lrg1	Angiogênese	+ 28,84
Gja5	Angiogênese/Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 26,83
Aqp1	Angiogênese	+ 26,68
Mgp	Ossificação	+ 22,92
C6	Angiogênese	+ 20,67
C3	Angiogênese	+ 20,62
Angptl4	Angiogênese	+ 17,20
Zfp36	Resposta inflamatória	+ 17,01
Kdr	Angiogênese	+ 16,90
Pparg	Diferenciação adipogênica	+ 18,86
Cdkn1c	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 13,27
Gdf3	Desenvolvimento do sistema esquelético	+ 13,11
Nov	Angiogênese/Resposta inflamatória	+ 11,32
Bmp2	Diferenciação de condrócito e de osteoblasto/Ossificação	+ 10,59
Cxcr2	Angiogênese	+ 10,59
Spp1	Resposta inflamatória/Ossificação/Diferenciação osteoblástica	+ 10,41
Tgfb1	Angiogênese/Organização da matriz extracelular	- 152,05
Cthrc1	Diferenciação osteoblástica	- 143,50
Il1rl1	Resposta inflamatória	- 98,85
Fbn2	Diferenciação osteoblástica	- 90,41
Col14a1	Organização de fibras colágenas	- 83,42
Lum	Desenvolvimento de cartilagem/Organização de fibras colágenas	- 76,39
Ccl12	Angiogênese/Resposta inflamatória	- 71,04
Ccna2	Proliferação de fibroblastos	- 68,23
Il-6	Resposta inflamatória	- 40,90
Ccl2	Resposta inflamatória	- 30,93
Ccnb1	Resposta celular à ácido graxo/Proliferação de fibroblastos	- 24,09

Genes	Processos Biológicos	Fold-Change
Mrc2	Diferenciação osteoblástica	- 23,78
Ccl11	Resposta inflamatória	- 21,82
Has2	Morfogênese do osso	- 17,56
Ccl7	Resposta inflamatória	- 15,97
Grem1	Angiogênese	- 14,42
Esm1	Angiogênese	- 12,11
Plau	Angiogênese	- 11,90
Ephb3	Angiogênese	- 11,35
Nr4a1	Angiogênese	- 11,31
Cxcl12	Resposta inflamatória	- 11,13
Tp63	Diferenciação osteoblástica/Desenv. do sistema esquelético	- 10,97
Asxl1	Desenvolvimento ósseo	- 10,78
Col1a1	Organiz. fibras colágenas/Difer. osteoblástica/Proc. regenerativo	- 10,34

Fontes: GeneSpring 14.8 GX Software/DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (<https://david.ncifcrf.gov>).

As Figuras 2 a 5 mostram o enriquecimento funcional dos processos biológicos de interesse em cada grupo de comparação. O enriquecimento funcional é avaliado pelo número de genes induzidos ou reprimidos que estão relacionados com um processo biológico específico.

No grupo CTMs-TA vs CTMs-MO, o enriquecimento funcional relacionou genes induzidos e reprimidos nos processos referentes ao desenvolvimento do sistema esquelético, regulação positiva da proliferação de células mesenquimais e endoteliais, regulação positiva da mineralização óssea, e em quantidade mais expressiva ainda nos processos de resposta inflamatória e angiogênese. Os processos biológicos relacionados ao desenvolvimento do tecido ósseo, organização de matriz extracelular e regulação negativa da diferenciação de osteoclastos foram enriquecidos exclusivamente por genes reprimidos (Figura 2).

Figura 2 – Enriquecimento funcional dos processos biológicos de interesse pelos genes induzidos e reprimidos no grupo de comparação CTMs-TA vs CTMs-MO. Fonte: DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis.

No grupo OBs-TA vs OBs-MO, o enriquecimento funcional relacionou genes induzidos e reprimidos no processo referente à resposta inflamatória. Os processos biológicos relacionados à angiogênese e à proliferação de CTMs foram enriquecidos apenas por genes induzidos enquanto que os processos relacionados à resposta imune inata, organização da matriz extracelular, desenvolvimento do sistema esquelético, ossificação e diferenciação osteoblástica foram enriquecidos somente por genes reprimidos (Figura 3).

Figura 3 – Enriquecimento funcional dos processos biológicos de interesse pelos genes induzidos e reprimidos no grupo de comparação OBs-TA vs OBs-MO. Fonte: DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis.

No grupo OBs-MO vs CTMs-MO, o enriquecimento funcional relacionou genes induzidos e reprimidos nos processos referentes à regulação positiva da diferenciação osteoblástica e ossificação. Os processos biológicos relacionados ao desenvolvimento do sistema esquelético, regulação positiva da proliferação de osteoblastos, organização da matriz extracelular, mineralização óssea, foram enriquecidos apenas por genes induzidos e em quantidade mais expressiva nos processos de resposta inflamatória e resposta imune. Os processos biológicos relacionados à regulação positiva da proliferação de CTMs, migração de células endoteliais, morfogênese do osso, regulação positiva da mineralização óssea, foram

enriquecidos somente por genes reprimidos e em quantidade mais significativa nos processos de diferenciação osteoblástica e angiogênese (Figura 4).

Figura 4 – Enriquecimento funcional dos processos biológicos de interesse pelos genes induzidos e reprimidos no grupo de comparação OBs-MO vs CTMs-MO. Fonte: DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis.

No grupo OBs-TA vs CTMs-TA, o enriquecimento funcional relacionou genes induzidos e reprimidos nos processos referentes à resposta inflamatória, angiogênese. Os processos biológicos relacionados à migração de células mesenquimais, regulação positiva da migração de células endoteliais, regulação negativa da diferenciação de osteoclasto, diferenciação de osteoblasto, desenvolvimento de tecido mineralizado, ossificação, foram enriquecidos apenas por genes induzidos e em quantidade mais expressiva nos processos de

organização da matriz extracelular e resposta imune. Os processos biológicos relacionados à regulação positiva da diferenciação de osteoblasto, organização de fibras colágenas, morfogênese do osso e desenvolvimento ósseo foram enriquecidos somente por genes reprimidos (Figura 5).

Figura 5 – Enriquecimento funcional dos processos biológicos de interesse pelos genes induzidos e reprimidos no grupo de comparação OBs-TA vs CTMs-TA. Fonte: DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis.

4.3 Confirmação dos dados do microarray por PCR em tempo real

Os resultados do PCR em tempo real confirmaram os dados do microarray para todos os genes de interesse analisados (Gdf10, Alpl, Ibsp, Dlx5, Mgp e Igf2). Pelo microarray,

a expressão do gene Gdf10 foi induzida, enquanto que as expressões dos genes Alpl, Ibsp e Dlx5 foram reprimidas no grupo CTMs-TA comparado ao CTMs-MO. As expressões dos genes Mgp e Igf2 foram induzidas no grupo OBs-MO em relação ao CTMs-MO. Esses dados estão de acordo com os resultados do PCR-RT, conforme mostra a Figura 6.

Figura 6 - Expressão relativa dos genes de interesse por PCR-RT (Student's t test, * $p \leq 0.05$).

5 Discussão

Considerando que não há um consenso estabelecido acerca da população de células que melhor poderia atuar sobre a regeneração óssea, nós investigamos as características moleculares, através da expressão gênica em larga escala, de CTMs isoladas da medula óssea e do tecido adiposo e de osteoblastos diferenciados a partir dessas células, com o objetivo de determinar se o tecido de origem e/ou o processo de diferenciação celular poderiam influenciar o potencial regenerativo dessas células.

No tocante ao tecido de origem, o agrupamento hierárquico das amostras mostrou que as CTMs isoladas de ambas as fontes apresentaram perfis de expressão gênica similares, porém diferenças na modulação de genes diretamente relacionados com os processos de diferenciação osteoblástica e de osteogênese, como o *Ibsp* (integrin-binding sialoprotein), *Alpl* (alkaline phosphatase) e *Dlx5* (distal-less homeobox 5), sugerem que as CTMs-MO apresentam um maior potencial de diferenciação osteoblástica, fato que, consequentemente, repercute positivamente no potencial osteogênico desse grupo de células. A fosfatase alcalina, que é considerada um dos principais marcadores de diferenciação osteoblástica, e a sialoproteína óssea, que é uma das proteínas não colágenas mais abundantes presente na matriz extracelular mineralizada, participam dos estágios iniciais da mineralização da matriz óssea (Tenenbaum & Heersche, 1982; Bianco et al., 1991; Gordon et al., 2007; Malaval et al., 2009; Monfoulet et al., 2010; Boulefontour et al., 2015). O *Dlx5* é um fator de transcrição relacionado à diferenciação osteoblástica (Heo et al., 2017) e tem um papel regulatório sobre a diferenciação adipogênica de CTMs. A indução do gene *Dlx5* inibe a diferenciação adipogênica, enquanto induz a diferenciação osteoblástica de CTMs (Lee et al., 2003; Lee et al., 2013). A expressão reprimida do gene *Dlx5* pelas CTMs-TA indica uma tendência ao maior potencial adipogênico dessas células. Adicionalmente, as CTMs-TA apresentaram uma sobre-expressão do gene *Gdf10* (growth differentiation factor 10), que é altamente expresso em adipócitos e atua como um regulador da adipogênese (Hino et al., 1999; 2012; Matsumoto et al., 2012). Esses achados corroboram com os obtidos por Wagner et al. (2005) que compararam CTMs-MO e CTMs-TA e relataram que as CTMs-MO exibiram um maior potencial osteogênico, caracterizado pela sobre-expressão de genes relacionados com os processos de ossificação, desenvolvimento do sistema esquelético e organização da matriz extracelular. Embora as CTMs isoladas de ambas as fontes apresentem perfis similares de expressão gênica (Lee et al., 2004), capacidade de diferenciação osteoblástica *in vitro* e potencial regenerativo *in vivo*, o maior potencial osteogênico atribuído às CTMs-MO em relação às CTMs-TA tem sido relatado em diversos

estudos (Im G-I et al., 2005; Sakaguchi et al., 2005; Peng et al., 2008; Niemeyer et al., 2010; Wu et al., 2015; Abuna et al., 2016; Brennan et al., 2017; Freitas et al., 2017). Em contrapartida, as CTMs-TA apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com o processo de neo-formação vascular, como o gene *Gsc* (goosecoid homeobox), *Ccl11* (chemokine C-C motif ligand 11) e o *Sfrp2* (secreted frizzled-related protein 2), o que caracteriza o perfil angiogênico desse grupo de células. Os genes *Gsc* e *Ccl11* estão relacionados com os processos de regulação positiva da proliferação de células endoteliais e de angiogênese. O gene *Sfrp2*, além de estar relacionado com os processos de diferenciação celular, também está envolvido nos processos de formação endocondral e regulação positiva da angiogênese. Estudos prévios mostraram que as CTMs-TA apresentam um melhor perfil pró-angiogênico que as CTMs-MO, o que concorda com os resultados do presente estudo (Amable et al., 2014; Cho et al., 2017). Esses achados, no entanto, diferem dos obtidos por Du et al. (2016) que relataram que as CTMs-MO são mais angiogênicas que as CTMs-TA. Porém, as análises do potencial angiogênico das células foram realizadas por ensaios distintos, o que pode ter contribuído para a divergência desses resultados. Apesar das CTMs de ambas as fontes apresentarem atividade angiogênica, estudos relatam um melhor desempenho de CTMs-TA em terapias de neo-vascularização (Tang et al., 2004; Rehman et al., 2004; Moon et al., 2006; Kim et al., 2007; Ikegame et al., 2011). A angiogênese tem um papel crucial no desenvolvimento e na regeneração do tecido ósseo e a co-aplicação de CTMs-MO e CTMs-TA tem favorecido a regeneração tecidual devido à somatória, respectivamente, das propriedades osteogênicas e angiogênicas inerentes de cada grupo de célula (Kim et al., 2014; Wang et al., 2016). Com relação às características imunomodulatórias, as CTMs de ambas as origens apresentaram grupos de genes diferencialmente expressos envolvidos com processos inflamatórios e resposta imune, o que confirma o potencial imunomodulatório das CTMs, já relatado em diversos estudos (Jansen et al., 2010; Kasim et al., 2015; Yoo et al., 2009; Heo et al., 2016). As propriedades imunomodulatórias aperfeiçoam o potencial regenerativo das CTMs pela modulação do processo inflamatório e pela manutenção da integridade tecidual (Montespan et al., 2014).

Ao contrário das similaridades apresentadas pelas CTMs, as diferenças na modulação da expressão gênica entre os OBs foram mais acentuadas, reflexos do potencial de diferenciação celular relacionado, sobretudo, com o tecido de origem. Os OBs-TA apresentaram uma expressão reprimida de genes diretamente relacionados com os processos de diferenciação osteoblástica, osteogênese, mineralização, ossificação, desenvolvimento esquelético e cartilaginoso, como o *Mepe* (matrix extracellular phosphoglycoprotein), *Mmp13* (matrix metalloproteinase 13), *Dlx5* (distal-less homeobox 5), *Ibsp* (integrin-binding

sialoprotein), Igf2 (insulin-like growth factor 2) e Alpl (alkaline phosphatase), ao passo que apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com os processos de diferenciação adipogênica, angiogênese e resposta à hipóxia, como o Aacs (acetoacetyl-CoA synthetase), Egr1 (early growth response 1), Adipoq (adiponectin), Rhob (ras homolog family member B), Kdr (kinase insert domain receptor) e Edn1 (endothelin 1). Esses achados mostram que os OBs-TA apresentam um perfil mais angiogênico enquanto que, os OBs-MO, um perfil mais osteogênico. A manutenção dos perfis de expressão gênica pelos OBs em relação às CTMs da qual se diferenciaram, aliado ao fato de que as células provenientes da medula óssea e do tecido adiposo apresentaram, respectivamente, uma sobre-expressão de genes ligados à osteogênese e adipogênese, independente da diferenciação celular, reforçam a hipótese de que as células preservam características do tecido de origem (Panepucci et al., 2004; Abuna et al., 2016).

Considerando a influência da diferenciação celular sobre os perfis de expressão gênica de OBs e CTMs, a análise comparativa de OBs-MO e CTMs-MO mostrou que os osteoblastos apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com os processos de ossificação, desenvolvimento do sistema esquelético e organização da matriz extracelular, como o Cdkn1c (cyclin-dependent kinase inhibitor 1 C), Igf2 (insulin-like fator 2), Mgp (matrix gla protein), Agt (angiotensinogen), Eln (elastin), Nox1 (NADPH oxidase 1) e Hp (haptoglobin) e, uma expressão reprimida, de genes relacionados com o processo regenerativo, morfogênese do osso, angiogênese e diferenciação osteoblástica, como o Ccl12 (chemokine C-C motif ligand 12), Mmp12 (matrix metalloproteinase 12), Has2 (hyaluronan synthase 2), Alyref (Aly/REF export factor), Tnn (tenascin N), Ccna2 (cyclin A2) e Egr1 (early growth response 1).

A análise comparativa de OBs-TA e CTMs-TA mostrou que os OBs apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com os processos de organização da matriz extracelular, metabolismo de lipídeos, resposta inflamatória e imune, como o Agt (angiotensinogen), CD36 (CD 36 molecule), Flt3 (fms-related tyrosine kinase 3), Orm1 (orosomucoid 1), S100a8 (S100 calcium binding protein A8) e Adipoq (adiponectin) e, uma expressão reprimida, de genes relacionados com os processos de organização de fibras colágenas, proliferação de fibroblastos, diferenciação osteoblástica e angiogênese, como o Tgfb1 (transforming growth factor beta induced), Cthrc1 (collagen triple helix repeat containing 1), Il1rl1 (interleukin 1 receptor-like 1), Fbn2 (fibrillin 2), Col14a1 (collagen type XIV alpha 1), Lum (lumican), Ccl12 (chemokine C-C motif ligand 12), Il-6 (interleukin 6), Ccna2 (cyclin A2), Ccnb1 (cyclin B1) e Mrc2 (mannose receptor C type 2). Em suma, as análises comparativas entre as CTMs e OBs mostraram que as CTMs de ambas as fontes apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com os processos de angiogênese, diferenciação

osteoblástica e morfogênese do tecido ósseo, o que caracteriza o potencial regenerativo das CTMs (Wagner et al., 2005; Peroni et al., 2008; Amable et al., 2014), ao mesmo tempo que sugerem que as CTMs podem estar mais envolvidas com os eventos iniciais que regem o processo regenerativo que os OBs. Além disso, enquanto os OBs-MO apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com os processos de ossificação, os OBs-TA apresentaram uma sobre-expressão de genes relacionados com a angiogênese, diferenciação adipogênica e metabolismo de lipídeos, dados que, em conjunto, demonstram mais uma vez a relação das células com o seu tecido de origem. Importante ainda ressaltar que diferenças relacionadas à diferenciação celular foram mais acentuadas no grupo OBs-MO vs CTMs-MO do que no grupo OBs-TA vs CTMs-TA, o qual apresentou uma maior expressão de genes envolvidos com o processo regenerativo comparado ao OBs-MO vs CTMs-MO. A maior proximidade dos OBs-TA em relação às CTMs, demonstrada pelo dendrograma, indica maior similaridade nos perfis de expressão gênica entre OBs-TA e CTMs. Da mesma forma, a maior distância entre OBs-MO e CTMs se traduz em maiores diferenças nos perfis de expressão gênica entre essas células. (Eisen et al., 1998; Zhao et al., 2014). Esses resultados sugerem que os OBs-MO podem ter atingido um estágio de diferenciação celular mais avançado em relação aos OBs-TA, o que poderia ser explicado pela hipótese de que as células provenientes da medula óssea apresentam um maior potencial de diferenciação osteoblástica comparada às células do tecido adiposo.

As análises dos perfis de expressão gênica de CTMs e OBs, de ambas as fontes, revelaram características que os tornam potencialmente capazes de serem utilizados em estratégias de terapia celular. No entanto, as diferenças moleculares demonstradas entre essas populações de células podem caracterizar assinaturas de expressão gênica próprias de cada população e assim determinar potenciais regenerativos distintos, o que poderia implicar em utilizações terapêuticas específicas. Nossos resultados sugerem que as células provenientes do tecido adiposo seriam mais indicadas para terapias angiogênicas, enquanto que as células provenientes da medula óssea seriam mais indicadas para terapias osteogênicas. Porém, mais estudos são necessários para determinar a população de células que melhor poderia favorecer a regeneração óssea em procedimentos de terapia celular.

6 Conclusões

As células preservaram características do tecido de origem. As células derivadas da medula óssea apresentaram um perfil mais osteogênico, enquanto que as células derivadas do tecido adiposo, um perfil mais angiogênico, independente da diferenciação celular. As células

derivadas do tecido adiposo apresentaram, em comparação às células derivadas da medula óssea, uma sobre-expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica.

As CTMs apresentaram, em comparação com os OBs, independentemente da origem, uma sobre-expressão de genes relacionados com as etapas iniciais do processo de regeneração tecidual.

Os OBs-MO apresentaram um perfil de expressão gênica mais distante e os OBs-TA, um perfil mais próximo às CTMs, em termos de similaridade de expressão gênica.

Referências*

- Abuna R. P., de Oliveira F. S., De S. Santos T., Guerra T. R., Rosa A. L., Beloti M. M. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*, v. 231, p. 204-214, 2016.
- Amable P. R., Teixeira M. V. T., Carias R. B. V., Granjeiro J. M., Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*, v. 5, p. 1-13, 2014.
- Almalki S. G., Agrawal D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, v. 92, p. 41-51, 2016.
- Asami T., Ishii M., Fujii H., Namkoong H., Tasaka S., Matsushita K., Ishii K., Yagi K., Fujiwara H., Funatsu Y., Hasegawa N., Betsuyaku T. Modulation of murine macrophage TLR7/8-mediated cytokine expression by mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 1-12, 2013.
- Belicchi M., Pisati F., Lopa R., Porretti L., Fortunato F., Sironi M., Scalamogna M., Parati E. A., Bresolin N., Torrente Y. Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res*, v. 77 (4), p. 475-486, 2004.
- Bianco P., Fisher L. W., Young M. F., Termine J. D., Robey P. G. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*, v. 49 (6), p. 421-426, 1991.
- Bianco P., Robey P. G., Simmons P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, p. 313-319, 2008.
- Black C. R. M., Goriainov V., Gibbs D., Kanczler J., Tare R. S., Oreffo R. O. C. Bone Tissue Engineering. *Curr Mol Biol Rep*, v. 1, p. 132-140, 2015.
- Bombonato-Prado K. F., Bellesini L. S., Junta C. M., Marques M. M., Passos G. A., Rosa A. L. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials. *J Biomed Mater Res A*, v. 88, p. 401-408, 2008.
- Bouleftour W., Juignet L., Bouet G., Granito R. N., Vanden-Bossche A., Laroche N., Aubin J. E., Lafage-Proust M., Vico L., Malaval L. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology – Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol*, v. 52, p. 60-77, 2015.
- Brennan M. A., Renaud A., Guilloton F., Mebarki M., Trichet V., Sensebé L., Deschaseaux F., Chevallier N., Layrolle P. Inferior in vivo osteogenesis and superior angiogenesis of human adipose tissue: a comparison with bone marrow-derived stromal stem cells cultured in xeno-free conditions. *Stem Cells Transl Med*, v. 6, p. 2160-2172, 2017.
- Brydone A. S., Meek D., MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*, v. 224, p. 1329-1343, 2010.
- Cao B., Zheng B., Jankowski R. J., Kimura S., Ikezawa M., Deasy B., Cummins J., Epperly M., Qu-Petersen Z., Huard J. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol*, v. 5 (7), p. 640-646, 2003.
- Caplan A. I. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*, v. 9, p. 641-650, 1991.

Caplan A. I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*, v. 11 (7-8), p. 1198-1210, 2005.

Caplan A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, v. 213, p. 341-347, 2007.

Caplan A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, v. 217, p. 318-324, 2009.

Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Jim Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, v. 25, p. 2739-2749, 2007.

Cho K., Park M., Kim Y., Woo S., Ryu K. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. *Sci Rep*, v. 7, p. 1-9, 2017.

Ciuffi S., Zonefrati R., Brandi M. L. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab*, v. 14(2), p. 217-226, 2017.

Cohnheim J. F. Ueber Entzündung und Eiterung. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, v. 40, p. 1-79, 1867.

Connolly J. F., Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J*, v. 71 (4), p. 105-107, 1986.

Connolly J. F. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*, v. 355 (supplement), p. S257-266, 1998.

Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

Da Silva Meirelles L., Fontes A. M., Covas D. T., Caplan A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 20, p. 419-427, 2009.

Da Silva Meirelles L., Malta T. M., Panepucci R. A., Da Silva W. A. Jr. Transcriptomic comparisons between cultured human adipose tissue-derived pericytes and mesenchymal stromal cells. *Genom Data*, v. 7, p. 20-25, 2016.

De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, v. 44 (8), p. 1928-1942, 2001.

Denisov E. V., Skryabin N. A., Gerashchenko T. S., Tashireva L. A., Wilhelm J., Buldakov M. A., Sleptcov A. A., Lebedev I. N., Vtorushin S. V., Zavyalova M. V., Cherdyntseva N. V., Perelmutter V. M. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44⁺CD24⁻ stemness. *Oncotarget*, v. 8 (37), p. 61163-61180, 2017.

Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Sergey V. Anisimov S. V., Zaritskey A. Y. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Differences and similarities. *Cell Cycle*, v. 11 (2), p. 377-383, 2012.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8 (4), p. 315-317, 2006.

- Du W. J., Chi Y., Yang Z. X., Li Z. J., Cui J.J., Song B. Q., Li X., Yang S. G., Han Z. B., Han Z. C. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Res Ther*, v.7, p. 163-174, 2016.
- Eckert M. A., Vu Q., Xie K., Yu J., Liao W., Cramer S. C., Zhao W. Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 33, p. 1322-1334, 2013.
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O., Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 14863-14868, 1998.
- Fang B., Song Y. P., Liao L. M., Han Q., Zhao R. C. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*, v. 38, p. 389-390, 2006.
- Forbes S., Vig P., Poulsom R., Thomas H., Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol*, v. 197, p. 510-518, 2002.
- Freitas G., Lopes H., Almeida A. L. G., Abuna R., Gimenes R., Souza L. E. B. et al. Potential of Osteoblastic Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue Associated with a Polymer/Ceramic Composite to Repair Bone Tissue. *Calcif Tissue Int*, v. 101, p. 312-320, 2017.
- Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I., Petrakova K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, v. 16 (3), p. 381-390, 1966.
- Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, v. 3, p. 393-403, 1970.
- 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 (4), p. 331-340, 1974.
- Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, v. 4 (5), p. 267-274, 1976.
- Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, v. 20 (3), p. 263-272, 1987.
- Fukumoto T., Sperling J. W., Sanyal A., Fitzsimmons J. S., Reinholz G. G., Conover C. A., O'Driscoll S. W. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 11 (1), p. 55-64, 2003.
- Gao L., Zhang L., Li S., Wei L., Luo B., He R., Xia S. Role of miR-452-5p in the tumorigenesis of prostate cancer: A study based on the Cancer Genome Atl (TCGA), Gene Expression Omnibus (GEO), and bioinformatics analysis. *Pathol Res Pract*, v. 17, p. 338-344, 2018.
- Gangji V., Hauzeur J. P., Matos C., De Maertelaer V., Toungouz M., Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg*, v. 86-A (6), p. 1153-1160, 2004.
- Garg N. K., Gaur S., Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand*, v. 64 (6), p. 671-672, 1993.

- Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res*, v. 100 (9), p. 1249-1260, 2007.
- Goel A., Sangwan S. S., Siwach R. C., Ali A. M. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*, v. 36, p. 203-206, 2005.
- Gordon J. A. R., Tye C. E., Sampaio A. V., Underhill T. M., Hunter G. K., Goldberg H. A. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, v. 41, p. 462-473, 2007.
- Goshima J., Goldberg V. M., Caplan A. I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed *in vivo* in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res*, v. 262, p. 298-311, 1991.
- Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimble J. M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, v. 189 (1), p. 54-63, 2001.
- Guindalini C. & Tufik S., Use of microarrays in the search of gene expression patterns - application to the study of complex phenotypes. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 29 (4), p. 370-374, 2007.
- Haddad R. & Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 1-14, 2014.
- Hao C., Shintani S., Shimizu Y., Kondo K., Ishii M., Wu H., Murohara T. Therapeutic angiogenesis by autologous adipose-derived regenerative cells: comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 307, p. H869-H879, 2014.
- Harasymiak-Krzyżanowska I., Niedojadlo A., Karwat J., Kotula L., Gil-kulik P., Sawiuk M., and Kocki J. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol Biol Lett*, v. 18, p. 479-493, 2013.
- Hauzeur J. & Gangji V. Phases 1–3 clinical trials using adult stem cells in osteonecrosis and nonunion fractures. *Stem Cells Int*, v. 2010, p. 1-4, 2010.
- Healey J. H., Zimmerman P. A., McDonnell J. M., Lane J. M. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop Relat Res*, v. 256, p. 280-285, 1990.
- Henry T. D., Pepine C. J., Lambert C. R., Traverse J. H., Schatz R., Costa M., Povsic T. J., Anderson R. D., Willerson J. T., Kesten S., Perin E. C. The Athena Trials: Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells for Refractory Chronic Myocardial Ischemia with Left Ventricular Dysfunction. *Catheter Cardiovasc Interv*, v. 89, p. 169-177, 2017.
- Heo J. S., Choi Y., Kim H., Kim H. O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*, v. 37, p. 115-125, 2016.
- Heo J. S., Lee S. G., Kim H. O. Distal-less homeobox 5 is a master regulator of the osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*, v. 40, p. 1486-1494, 2017.
- Hernigou P. & Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res*, v. 405, p. 14-23, 2002.
- Hernigou P., Poignard A., Beaujean F., Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, v. 87 (7), p. 1430-1437, 2005.

Hino J., Hisayuki M., Kangaw K. Bone Morphogenetic Protein-3b (BMP-3b) Gene Expression Is Correlated with Differentiation in Rat Calvarial Osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 256, p. 419-424, 1999.

Hino J., Miyazawa T., Miyazato M., Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex. *Int J Obes*, v. 36, p. 725-734, 2012.

Horwitz E. M., Prockop D. J., Fitzpatrick L. A., Koo W. W. K., Gordon P. L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J. C., Pyeritz R. E., Brenner M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, v. 5 (3), p. 309-313, 1999.

Horwitz E. M., Prockop D. J., Gordon P. L., Koo W. W. K., Fitzpatrick L. A., Neel M. D., McCarville M. E., Orchard P. J., Pyeritz R. E., Brenner M. K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, v. 97, p. 1227-1231, 2001.

Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K. K., Jeffrey C. Marx J. C., Michael D. Neel M. D., Rene Y. McNall R. Y., Muul L., Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99 (13), p. 8932-8937, 2002.

Horwitz E. M., Andreef M., Frassoni F. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*, v. 13 (6), p. 419-425, 2006.

Huang S1, Xu L, Zhang Y, Sun Y, Li G. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats. *Cell Transplant*, v. 24, p. 2643-2655, 2015.

Ikegame Y., Yamashita K., Hayashi S., Mizuno H., Tawada M., You F., Yamada K., Tanaka Y., Egashira Y., Nakashima S., Yoshimura S., Iwama T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytherapy*, v. 13, p. 675-685, 2011.

Im G-I, Shin Y., Lee K. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, v. 13, p. 845-853, 2005.

Im G-I. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 105A, p. 2640-2648, 2017.

Inaoka K., Inokawa Y., Nomoto S. Genomic-Wide Analysis with Microarrays in Human Oncology. *Microarrays*, v. 4, p. 454-473, 2015.

Izadpanah R, Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J. M., and Bunnell B. A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, v. 99 (5), p. 1285-1297, 2006.

Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I., Bruder S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, v. 64, p. 295-312, 1997.

- Jansen B. J. H., Gilissen C., Roelofs H., Schaap-Oziemlak A., Veltman J. A., Raymakers R. A. P. et al. Functional Differences Between Mesenchymal Stem Cell Populations are Reflected by Their Transcriptome. *Stem Cells Dev*, v. 19 (4), p. 481-489, 2010.
- Jung W. Y., Kang J. H., Kim K. G., Kim H. S., Jang B. I., Park Y. H., Song I. Human adipose-derived stem cells attenuate inflammatory bowel disease in IL-10 knockout mice. *Tissue Cell*, v. 47, p. 86-93, 2015.
- Kachgal S. & Putnam A. J. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*, v. 14 (1), p. 47-59, 2011.
- Kaneto C. M., Lima P. S. P., Prata K. L., Dos Santos J. L., De Pina Neto J. M. P., Panepucci R. A., Noushmehr H., Covas D. T., De Paula F. J. A., Silva W. A. Jr. Gene expression profiling of bone marrow mesenchymal stem cells from Osteogenesis Imperfecta patients during osteoblast differentiation. *Eur J Med Genet*, v. 60, p. 326-334, 2017.
- Kasim N. H. A., Govindasamy V., Gnanasegaran N., Musa S., Pradeep P.J., Srijaya T. C., Aziz Z. A. C. A. Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. *J Tissue Eng Regen Med*, v. 9, p. E252-E266, 2015.
- Kayabasi C., Okcanoglu T. B., Yelken B. O., Asik A., Susluer S. Y., Avci C. B., Saydam G., Gunduz C. Comparative effect of imatinib and ponatinib on autophagy and miRNome in chronic myeloid leucemia, v. 637, p. 173-180, 2017.
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, v. 24, p. 1294-1301, 2006.
- Kim Y. J., Kim H. K., Cho H. H., Bae Y. C., Suh K. T., Jung J. S. Direct Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular Ischemia. *Cell Physiol Biochem*, v. 20, p. 867-876, 2007.
- Kim S., Shin Y., Yang K., Kim S., Yoo M., Han S., Im S., Won Y., Sung Y., Jeon T., Chang C., Jang J., Lee S., Kim H., Lee S. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron™) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord*, v. 2009, p. 10-20, 2009.
- Kim K., Park S., Im G. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, v. 35, p. 4792-4804, 2014.
- Kode J. A., Mukherjee S., Joglekar M. V., Hardikar A. A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, v. 11, p. 377-391, 2009.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 10711-10716, 1999.
- Krampera M., Galipeau J., Shi Y., Tarte K., Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, v. 15, p. 1054-1061, 2013.
- Kulakov A. A., Goldshtein D. V., Grigoryan A. S., Rzhabinova A. A., Alekseeva I. S., Arutyunyan I. V., Volkov A. V. Clinical study of the efficiency of combined cell transplant on

the basis of multipotent mesenchymal stromal adipose tissue cells in patients with pronounced deficit of the maxillary and mandibular bone tissue. *Bull Exp Biol Med*, v. 146 (4), p. 522-525, 2008.

Kulterer B., Friedl G., Jandrositz A., Sanchez-Cabo F., Prokesch A., Paar C., Scheideler M., Windhager R., Preisegger K. H., Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, v. 8 (70), p. 1-15, 2007.

Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, v. 363, p. 1439-1441, 2004.

Lee M. H., Kim Y. J., Kim H. J., Park H. D., Kang A. R., Kyung H. M. et al. BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- β 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *J Biol Chem*, v. 278 (36), p. 34387-34394, 2003.

Lee O. K., Kuo T. K., Chen W., Lee K., Hsieh S., Chen T. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, v. 103, p. 1669-1675, 2004.

Lee R. H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H. S., Suh K., Bae Y. C., Jung J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*, v. 14 (4-6), p. 311-335, 2004.

Lee H. L., Woo K. M., Ryoo H. M., Baek J. H. Distal-Less Homeobox 5 Inhibits Adipogenic Differentiation Through the Down-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Expression. *J Cell Physiol*, v. 228, p. 87-98, 2013.

Malaval L., Monfoulet L., Fabre T., Pothuau L., Bareille R., Miraux S., Thiaudiere E., Raffard G., Franconi J., Lafage-Proust M., Aubin J. E., Vico L., Joëlle Amédée J. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone*, v. 45 (5), p. 853-861, 2009.

Manieri N. A., Mack M. R., Himmelrich M. D., Worthley D. L., Hanson E. M., Eckmann L., Wang T. C., Stappenbeck T. S. Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis. *J Clin Invest*, v. 125 (9), p. 3606-3618, 2015.

Matsumoto Y., Otsuka F., Hino J., Miyoshi T., Takano M., Miyazato M., Makino H., Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Mol Cell Endocrinol*, v. 350, p. 78-86, 2012.

Meguid E. A., Ke Y., Ji J., El-Hashash A. H. K. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. *J Cell Physiol*, v. 9999, p. 1-11, 2017.

Melief S. M., Zwaginga J. J., Fibbe W. E., Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med*, v. 2, p. 455-463, 2013.

Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L. W., Robey P. G., Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100 (10), p. 5807-5812, 2003.

Mizuno H., Tobita M., Uysal C. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells*, v. 30, p. 804-810, 2012.

Molendijk I., Bonsing B. A., Roelofs H., Peeters K. C. M. J., Wasser M. N. J. M., , Dijkstra G., 5 C. Woude J., Duijvestein M., Veenendaal R. A., Zwaginga J., Verspaget H. W., Fibbe W. E., Jong A. E., Hommes D. W. Allogeneic bone marrow - derived mesenchymal stromal cells promote healing of refractory perianal fistulas in patients with Crohn's Disease. *Gastroenterology*, v. 149, p. 918-927, 2015.

Monfoulet L., Malaval L., Aubin J. E., Rittling S. R., Gadeau A. P., Fricain J., Chassande O. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone*, v. 46, p. 447-452, 2010.

Montespan F., Deschaseaux F., Sensébé L., Carosella E. D., Rouas-Freiss N. Osteodifferentiated Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue Express HLA-G and Display Immunomodulatory Properties in HLA-Mismatched Settings: Implications in Bone Repair Therapy. *J Immunol Res*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

Moon M. H., Kim S. Y., Kim Y. J., Kim S. J., Lee J. B., Bae Y. C., Sung S. M., Jung J. S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem*, v. 17, p. 279-290, 2006.

Moore W. R., Graves S. E., Bain G. I. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*, v. 71, p. 354-361, 2001.

Mueller S. M., Glowacki J., Age-Related Decline in the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-Dimensional Collagen Sponges. *J Cell Biochem*, v. 82, p. 583-590, 2001.

Murphy M. B., Moncivais K., Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, v. 45, p. 1-16, 2013.

Najar M., Raicevic G., Boufker H. I., Kazan H. F., Bruyn C., Meuleman N., Bron D., Tougouz M., Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*, v. 264, p. 171-179, 2010.

Niemeyer P., Fechner K., Milz S., Richter W., Suedkamp N. P., Mehlhorn A. T., Pearce S., Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, v. 31, p. 3572-3579, 2010.

Noël D., Caton D., Roche S., Bony C., Lehmann S., Casteillac L., Jorgensen C., Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*, v. 314, p. 1575-1584, 2008.

Owen M. & Friedenstein A. J. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. *Novartis Found Symp* (136), p. 42-60, 1988.

Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*, v. 9 (18), p. 1-27, 2014.

Oryan A., Papaioannou N., Kamali A., Stylianaki I., Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulation: Implications in Bone Tissue Engineering. *Int Clin Pathol J*, v. 2, p. 1-3, 2016.

Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Eslaminejad M. B. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*, v. 204, p. 59-83, 2017.

Panepucci R., Siufi J. L. C., Silva Junior W. A., Proto-Siqueira R., Neder L., Orellana M. et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v. 22, p. 1263-1278, 2004.

Peng L., Jia Z., Yin X., Zhang X., Liu Y, Chen P., Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*, v. 17, p. 761-773, 2008.

Peroni D., Scambi I., Pasini A., Lisi V., Bifari F., Krampera M. et al. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res*, v. 314, p. 603-615, 2008.

Pevsner-Fischer M., Levin S., Zipori D. The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev*, v. 7, p. 560-568, 2011.

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, p. 2896-2902, 2007.

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K. et al. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284 (2), p. 143-147, 1999.

Prockop D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, v. 276, p. 71-74, 1997.

Ra J. C., Kang S. K., Shin I. S., Park H. G., Joo S. A., Kim J. G., Kang B., Lee Y. S., Nakama K., Piao M., Sohl B., Kurtz A. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*, v. 9 (181), 1-11, 2011.

Rebelatto C. K., Aguiar A. M., Moretão M. P., Senegaglia A. C., Hansen P., Barchiki F., Oliveira J., Martins J., Kuligovski C., Mansur F., Christofis A., Amaral V. F., Brofman P. S., Goldenberg S., Nakao L. S., Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med*, v. 233, p. 901-913, 2008.

Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C. J., Bovenkerk J. E., Pell C. L., Johnstone B. H., Considine R. V., March K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, v. 109, p. 52-58, 2004.

Roson-Burgo B., Sanchez-Guijo F., Del Cañizo C., De Las Rivas J. Insights into the human mesenchymal stromal/stem cell identity through integrative transcriptomic profiling. *BMC Genomics*, v. 17:944, p. 1-27, 2016.

Saad A., Dietz A. B., Herrmann S. M. S., Hickson L. J., Glockner J. F., McKusick M. A., Misra S., Bjarnason H., Armstrong A. S., Gastineau D. A., Lerman L. O., Textor S. C. Autologous Mesenchymal Stem Cells Increase Cortical Perfusion in Renovascular Disease. *J Am Soc Nephrol*, v. 28 (9), p. 2777-2785, 2017.

Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. Comparison of Human Stem Cells Derived From Various Mesenchymal Tissues. *Arthritis Rheum*, v. 52, p. 2521-2529, 2005.

Sato Y., Araki H., Kato J., Nakamura K., Kawano Y., Kobune M., Sato T., Miyanishi K., Takayama T., Takahashi M., Takimoto R., Iyama S., Matsunaga T., Ohtani S., Matsuura A., Hamada H., Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, v. 106, p. 756-763, 2005.

Secunda R., Vennila R., Mohanashankar A. M., Rajasundari M., Jeswanth S., Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*, v. 67, p. 793-807, 2015.

Sharma R. R., Pollock K., Hubel A., McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, v. 54, p. 1418-1437, 2014.

Silva W. A., Jr., Dimas T. Covas D. T., Panepucci R. A., Proto-Siqueira R., Siufi J. L. C., Zanette D. L., Santos A. R. D., Zago M. A. The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v. 21, p. 661-669, 2003.

Smadja D. M., C d'Audigier C., Guerin C. L., Mauge L., Dizier B., J-S Silvestre J-S., Cortivo L. D., P Gaussem P., Emmerich J. Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia. *Bone Marrow Transplant*, v. 47, p. 997-1000, 2012.

Smith J. O., Aarvold A., Tayton E. R., Dunlop D. G., Oreffo R. O. C., Phil D. Skeletal tissue regeneration: current approaches, challenges, and novel reconstructive strategies for an aging population. *Tissue Eng Part B Rev*, v. 17 (5), p. 307-320, 2011.

Song J., Volz S., Liadaki M. E., Mailänder P., Kalousis K. Stem cells therapy: the future in the management of systemic sclerosis? A case report. *Hell J Nucl Med*, v. 20 (supplement 164), 2017.

Song Y., Du H., Dai C., Zhang L., Li S., Hunter D. J., Lu L., Bao C. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med*, rme-2017-0152, 2018.

Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, v. 33, p. 919-926, 2003.

Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. Same or Not the Same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, v. 0, p. 1-29, 2012.

Taguchi K., Ogawa R., Migita M., Hanawa H., Ito H., Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 331, p. 31-36, 2005.

Tang Y. L., Zhao Q., Zhang Y. C., Cheng L., Liu M., Jianhui Shi J., Yang Y. Z., Pan C., Ge J., Phillips M. I. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, v. 117, p. 3-10, 2004.

Tenenbaum H. C., Heersche J. N. M. Differentiation of Osteoblasts and Formation of Mineralized Bone in Vitro. *Calcif Tissue Int*, v. 34, p. 76-79, 1982.

Tögel F., Weiss K., Yang Y., Hu Z., Zhang P., Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 292, p. 626-635, 2007.

Trohatou O. & Roubelakis M. G. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine: past, present, and future. *Cell Reprogram*, v. 19 (4), p. 217-224, 2017.

Tsai M. S., Lee J. L., Chang Y. J., Hwang S. M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, v. 19 (6), p. 1450-1456, 2004.

Undale A. H., Westendorf J. J., Yaszemski M. J., Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc*, v. 84 (10), p. 893-902, 2009.

Vallone V. B. F., Romaniuk M. A., Choi H., Labovsky V., Otaegui J., Chasseing N. A. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation*, v. 85, p. 1-10, 2013.

Verrier S., Alini M., Alsberg E., Buchman S. R., Kelly D., Laschke M. W., Menger M. D., Murphy W. L., Stegemann J. P., Schütz M., Miclau T., Stoddart M. J., Evans C. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. *Eur Cell Mater*, v. 32, p. 87-110, 2016.

Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, v. 33, p. 1402-1416, 2005.

Wang B., Sun W., Shi Z., Zhang N., Yue D., Guo W., Xu S., Lou J., Li Z. Treatment of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head with the implantation of core decompression and concentrated autologous bone marrow containing mononuclear cells. *Arch Orthop Trauma Surg*, v. 130, p. 859-865, 2010.

Wang Z., Li Z., Dai T., Zong C., Liu Y., Liu B. Addition of Adipose-Derived Stem Cells to Mesenchymal Stem Cell Sheets Improves Bone Formation at an Ectopic Site. *Int J Mol Sci*, v. 17, p. 70-80, 2016.

Waese E. Y. L., Kandel R. R., Stanford W. L. Application of stem cells in bone repair. *Skeletal Radiol*, v. 37, p. 601-608, 2008.

Wu W., Le A. V., Mendez J. J., Chang J., Niklason L. E., Steinbacher. Osteogenic Performance of Donor-Matched Human Adipose and Bone Marrow Mesenchymal Cells Under Dynamic Culture. *Tissue Eng Part A*, v. 21 (9,10), p. 1621-1632, 2015.

Yoo K. H., Jang I. K., Lee M. W., Kim H. E., Yang M. S., Eom Y., Lee J. E., Kim Y. J., Yang S. K., Jung H. L., Sung K. W., Kim C. W., Koo H. H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*, v. 259, p. 150-156, 2009.

Younger E. M. & Chapman M.W. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, v. 3, p. 192-195, 1989.

Zhang H., Liu J., Fu X., Yang A. Identification of Key Genes and Pathways in Tongue Squamous Cell Carcinoma Using Bioinformatics Analysis. *Med Sci Monit*, v. 23, p. 5924-5932, 2017.

Zhao S., Guo Y., Sheng Q., Shyr Y. Advanced Heat Map and Clustering Analysis Using Heatmap3. *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 1-6, 2014.

Zhou L., Qiu S., Lv L., Li Z., Liu H., Tang R., Ma K., Liu B. Integrative bioinformatics analysis provides insight into the molecular mechanisms of chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*, v. 43, p. 568-581, 2018.

Zhuang Q., Mao W., Xu P., Li H., Sun Z., Li S., Qiu G., Li J., Zhang J. Identification of differential genes expression profiles and pathways of bone marrow mesenchymal stem cells of adolescent idiopathic scoliosis patients by microarray and integrated gene network analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*, v. 41 (10), p. 840-855, 2016.

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng*, v. 7 (2), p. 211-228, 2001.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Prosper Benhaim P., Hedrick M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

Zvaifler N. J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C. J., Moss J., Burger J. A., Maini R. N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, v. 2 (6), p. 477-488, 2000.

Zwingenberger S., Nich C., Valladares R.D., Yao Z., Stiehler M., Goodman S.B. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs*, v. 26, p. 245-256, 2012.

* De acordo com a ABNT NBR 6023

Anexo A – Ofício da Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 079/2016

Ribeirão Preto, 17 de agosto de 2016.

RAMAL: 154785

Ref. processo nº 2016.1.504.58.8

Senhor Pesquisador,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 40ª Sessão Ordinária, realizada em 17 de agosto de 2016, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "**Avaliação das Assinaturas Moleculares de Células-Tronco Mesenquimais e Osteoblastos**", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 17/08/2018**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Michel Reis Messorá', is written over the printed name.

Prof. Dr. Michel Reis Messorá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

/batn

Anexo B – Arquivo completo dos genes com fold-change ≥ 2.0