



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS DE
INTERESSE REGIONAL

ANA GABRIELLEN SOUSA DO NASCIMENTO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE
DIFERENCIAÇÃO MESENQUIMAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS
SINALIZADORAS MEDICINAIS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO
ADIPOSO SUBCUTÂNEO MURINO**

Orientador:

Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

Teresina

2023

ANA GABRIELLEN SOUSA DO NASCIMENTO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE
DIFERENCIAÇÃO MESENQUIMAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS
SINALIZADORAS MEDICINAIS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO
ADIPOSO SUBCUTÂNEO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional – PPGTAIR, da Universidade Federal do Piauí – UFPI, na área de concentração Diagnósticos Avançados em Medicina Veterinária e linha de pesquisa Biotecnologia celular e Aplicabilidades, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

Teresina

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

N244a

Nascimento, Ana Gabriellen Sousa do.

Análise comparativa da expressão gênica de marcadores de diferenciação mesenquimal em linhagens de células sinalizadoras medicinais isoladas da medula óssea e tecido adiposo subcutâneo murino / Ana Gabriellen Sousa do Nascimento. -- 2023.

78 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2023.

“Orientador: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto .”

1. Plasticidade. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Expressão gênica I. Argôlo Neto, Napoleão Martins. II. Título.

CDD 637.634

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE
DIFERENCIAÇÃO MESENQUIMAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS
SINALIZADORAS MEDICINAIS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO
ADIPOSO" SUBCUTÂNEO MURINO

ANA GABRIELLEN SOUSA DO NASCIMENTO

BANCA EXAMINADORA:



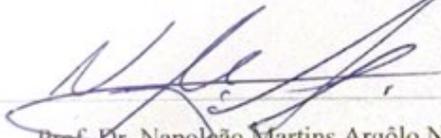
Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
(Examinador Externo) / UNESP



Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmento
(Examinador Interno) / DZO/CCA/UFPI



Prof. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra
(Examinadora Externa/Coorientadora) / IFPI



Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto
(Presidente / Orientador) / DCCV/CCA / UFPI

AGRADECIMENTOS

À Deus e à todas as forças que regem o universo que me mantiveram firmes durante esta caminhada.

À Universidade Federal do Piauí por todo apoio.

À CNPQ pela disponibilização de bolsa de mestrado que foram cruciais para minha permanência na pós-graduação.

Aos meus pais por sempre acreditarem e acatarem minhas escolhas, especialmente à minha mãe Silvana, pelas palavras de incentivo a sempre perseverar em busca dos meus objetivos.

Ao meu namorado por sempre ter apoiado meus sonhos, pelas palavras de incentivo e pela compreensão.

Aos demais familiares e amigos distantes por todo suporte direta e indiretamente por todos esses anos.

Ao NUPCELT e toda equipe que o compõe por terem sido minha segunda casa e família por todos esses anos.

Ao Professor Napoleão, por seu apoio, pela orientação, pelas conversas, pela amizade e pela paciência nesta caminhada. Serei eternamente grata por seus ensinamentos.

À minha equipe do LABCELT, Prof^ª. Dayseanny, Maria de Fátima, Laís, Kamilla e demais pós-graduandas por terem sido luz nesse processo, vocês foram parte fundamental na realização deste trabalho, obrigada pela colaboração e pelo empenho de todos.

Ao Hermínio, nosso cirurgião do núcleo por todo esforço, suporte e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos colaboradores do núcleo, Maria, Gleuce e Paulinho por todas as conversas, por todos os cafés maravilhosos e pela amizade durante estes anos.

À professora Socorro, Felipe e demais pós-graduandos da BIOMOL por todo apoio técnico para realização do experimento, seus ensinamentos foram fundamentais para concretização deste trabalho.

À professora Acelina e professor Miguel pelo apoio e incentivo à pesquisa. Ao Prof. Lindemberg e ao Mérick por todo suporte na análise de dados.

E por fim, aos animais utilizados nesta pesquisa. Minha eterna gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- FIGURA 1 – Representação esquemática da provável função das células sinalizadoras medicinais (MSC) *in vivo*. A: Pericitos são estimulados pela injúria tecidual a migrarem e diferenciarem-se em MSCs. B: interação entre MSCs e células do sistema imunológico, e os fatores tróficos produzidos pela mesma. FONTE: CAPLAN, CORREA (2011, p. 14). 166
- FIGURA 2 – Múltiplos fatores que controlam a provável diferenciação de células sinalizadoras medicinais, incluindo fatores químicos, físicos e biológicos. FONTE: CHEN et al (2016, p. 1133). 199
- FIGURA 3 - Vias de sinalização e fatores chave de transcrição na regulação da diferenciação adipogênica de células sinalizadoras medicinais. FONTE: CHEN et al (2016, p. 1130) 211
- FIGURA 4 - O efeito da imunomodulação mediada por células sinalizadoras medicinais em células imunes. FONTE: Modificado de HUANG, WU, TAM (2022)..... 244

Manuscrito

- Fig. 1 Células sinalizadoras medicinais (MSCs) de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) oriundas de medula óssea (BMMSC) e tecido adiposo subcutâneo (ADSC).....38
- Fig. 2 Culturas de ADSC e BMMSC em terceira passagem submetidas a ensaio de Scratch Wound Healing ao longo de 12 (A e E), 24 (B e F), 48 (C e G) e 72 horas (D e H), respectivamente. Não foram identificadas diferenças ($p \geq 0,05$) entre as áreas de falha.....39
- Fig. 3 Análise da plasticidade e expressão gênica osteogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B indução adipogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em vermelho indica presença de matriz extracelular composta por fosfatos de cálcio. Barra de escala 500 μ m. I: expressão gênica da osteopontina (OTP) e sialoproteína óssea (IBS) de acordo com o fator origem. II: expressão gênica da proteína morfogenética óssea II (BMP2) e Osterix (OTX) de acordo com o fator interação entre origem e condição. *Significante ($p \leq 0,05$).....40
- Fig. 4 Análise da plasticidade e expressão gênica condrogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B indução condrogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em azul indica presença de matrix extracelular composta de proteoglicanos. Barra de escala 500 μ m. Expressão gênica de colágeno tipo II (COLII) e proteína central de proteoglicano (ACCAN) de acordo com o fator interação entre origem e condição. *Significante ($p \leq 0,05$).....41
- Fig. 5 Análise da plasticidade e expressão gênica condrogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B indução adipogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em vermelho indica presença de lipídeos nas células. Barra de escala 500 μ m. Expressão gênica de lipoproteína lipase (LPL) e adiponectina (ADIPOQ) de acordo com o fator interação entre origem e condição. *Significante ($p \leq 0,05$).....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos usadas para análise de qPCR.....	35
--	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

- MSC: células sinalizadoras medicinais
- BMMSC: células sinalizadoras medicinais da medula óssea
- ADSC: células sinalizadoras medicinais adipoderivadas
- qPCR: reação da cadeia da polimerase quantitativa
- UFC-F: unidade formadora de colônias fibroblásticas
- HLA-DR: receptor de superfície celular MHC classe II
- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCA: Centro de Ciências Agrárias
- CEEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
- NGS: sequenciamento de nova geração
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- RNA: ácido ribonucleico
- cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar
- RUNX2: fator de transcrição *run related 2*
- COL1A1: colágeno tipo 2
- PPAR γ : proliferadores de peroxissomas tipo gama
- FABP4: proteína ligante de ácidos graxos do tipo 4
- SOX9: fator de transcrição *sox9*
- ACAN: agrecano
- COL2A1: colágeno tipo 2
- ATP: adenosina trifosfato
- β CCAAT: Proteínas Estimuladoras de Ligação a CCAAT beta
- C/EBP δ : As proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT
- cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina
- miR-431: micro RNA 431
- miR-17-5p: micro RNA 17-5p
- BMPRs: receptores de proteínas morfogenéticas ósseas
- SMAD: transdutores de sinal para receptores da superfamília do fator de crescimento transformador beta
- mL: mililitros

rpm: rotações por minuto

μl: microlitros

nM: nanomolar

seg: segundos

Pos-hoc: análises estatísticas após a visualização dos dados

RESUMO

A evolução da compreensão sobre a origem e identidade de células sinalizadoras medicinais (MSC) tem levado a uma nova perspectiva sobre suas funções e aplicações terapêuticas. A relação entre as diferentes subpopulações/linhagem de MSCs, sua capacidade de diferenciação *in vitro*, seu imunofenótipo e, subsequentemente, sua expressão gênica ainda são pouco conhecidos, permanecendo relevantes incertezas sobre a real plasticidade das MSCs e o seu potencial terapêutico. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo comparar a expressão gênica de alguns genes relacionados à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica antes e após a indução de diferenciação *in vitro*, em MSCs oriundas da medula óssea (BMMSC) e tecido adiposo (ADSC) subcutâneo murino. Para isto, as células foram coletadas, isoladas e cultivadas até a terceira passagem sob condições controladas de CO₂ e temperatura. Foram realizados ensaios de proliferação por *Scratch Wound Healing*, imunofenotipagem para os anticorpos CD90, CD45, CD105 e CD14, ensaio de plasticidade através da indução à diferenciação *in vitro* e análise de expressão gênica por técnica de qPCR para os genes: OTP, IBS, BMP2 e OTX para linhagem osteogênica; LPL e ADIPOQ para linhagem adipogênica; COLL II e AGGRECAN para linhagem condrogênica. Sob as condições experimentais do presente estudo, o tecido de origem de coleta exerceu efeito sobre a expressão da maior parte dos marcadores de diferenciação mesenquimal. As BMMSCs indiferenciadas apresentaram maior expressão *in vitro* dos genes associados às linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, mas não se evidenciou expressão gênica típica de osteoblastos e adipócitos em BMMSCs diferenciadas. A expressão gênica relacionada a condrogênese foi considerada inconclusiva, não sendo possível afirmar, com segurança, se houve ou não diferenciação verdadeira. A expressão tanto de marcadores considerados fatores de transcrição ou de crescimento indutores de diferenciação, denotam o provável potencial modulador *in vitro* de BMMSCs e ADSCs para as diferenciações mesenquimais estudadas.

Palavras-chave: Plasticidade; células-tronco mesenquimais; expressão gênica;

ABSTRACT

The evolution of understanding about the origin and identity of medicinal signaling cells (MSC) has led to a new perspective on their functions and therapeutic applications. The relationship between the different subpopulations/lineages of MSCs, their ability to differentiate in vitro, their immunophenotype and, subsequently, their gene expression are still poorly understood, with relevant uncertainties about the real plasticity of MSCs and their therapeutic potential. Thus, the present work aims to compare the gene expression of some genes related to osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation before and after in vitro induction of differentiation in MSCs originating from bone marrow (BMMSC) and subcutaneous adipose tissue (ADSC) murine. For this, cells were collected, isolated and cultured until the third passage under controlled conditions of CO₂ and temperature. Prolificity assays were carried out by Scratch Wound Healing, immunophenotyping for CD90, CD45, CD105 and CD14 antibodies, plasticity assay through in vitro differentiation induction and gene expression analysis by qPCR technique for the genes: OTP, IBS, BMP2 and OTX for osteogenic lineage; LPL and ADIPOQ for adipogenic lineage; COLL II and ACCAN for chondrogenic lineage. Under the experimental conditions of the present study, the tissue from which the sample was collected had an effect on the expression of most mesenchymal differentiation markers. Undifferentiated BMMSCs showed higher in vitro expression of genes associated with osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages, but there was no evidence of gene expression typical of osteoblasts and adipocytes in differentiated BMMSCs. Gene expression related to chondrogenesis was considered inconclusive, and it is not possible to state with certainty whether or not there was true differentiation. The expression of both markers considered transcription or growth factors that induce differentiation, denote the probable in vitro modulating potential of BMMSCs and ADSCs for the mesenchymal differentiations studied.

Keywords: Plasticity; mesenchymal stem cells; gene expression;

Teresina

2023

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Identidade de MSCs	14
2.2 Plasticidade de MSC.....	18
2.3 Imunomodulação.....	23
3. CAPÍTULO I.....	25
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICES	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

As células sinalizadoras medicinais (MSCs), também conhecidas como “células estromais” ou “células-tronco mesenquimais”, ao longo dos anos, têm sido objeto de estudo intensivo, e sua origem e nomenclatura passaram por uma evolução significativa. Inicialmente, o conceito para defini-las estava atrelado a sua provável capacidade de originar novos tecidos, pois eram consideradas células progenitoras somáticas (CAPLAN, 1991; PITTENGER, 1999). Contudo, após ter sido isolada de diversos tecidos adultos, constatou-se sua localização perivascular (CRISAN, 2007; MEIRELLES *et al.*, 2008), identificadas em pequenas quantidades em todos os nichos orgânicos. Dessa forma, MSCs foram isoladas tanto em anexos fetais, como cordão umbilical e placenta, quanto em tecidos adultos, como medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, bulge folicular e em órgãos parenquimatosos (JONES *et al.*, 2002; HANIFFA *et al.*, 2007; FRASER *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2013).

Recentemente, evidenciou-se a capacidade das MSCs secretarem peptídeos bioativos como quimiocinas, fatores de transcrição e fatores de crescimento, com capacidade de interação mútua com o nicho celular adjacente (MEIRELLES, CAPLAN, NARDI, 2008). Foi então proposto que estas células poderiam comportar-se como “*drogarias*” no fornecimento de metabólitos com potencial para modular a resposta inflamatória e sinalização celular local (CAPLAN, CORREA, 2011). Foi então proposto que a nomenclatura mais adequada seria “células sinalizadoras medicinais”, cuja provável função de imunomodulação local poderia mediar a homeostase tecidual e estimular células progenitoras a diferenciarem-se para manutenção do nicho tecidual (CAPLAN, 2017; ROBEY, 2017). Desta forma, as MSCs apresentam relevante potencial terapêutico como moduladoras da reparação tecidual e tem sido propostas diversas aplicações experimentais para tratamento de diversas patologias em animais e seres humanos (POGGI; VARESANO; ZOCCHI, 2018; SONG, SCHOLTEMEIJER, SHAH, 2020).

A atividade de imunomodulação poderia estar subordinada à interação entre as MSCs e o nicho anatômico no qual estejam inseridas. Desta forma, sinalização de quiescência reduziria a atividade destas células, bem como sinalização inflamatória Th1 ou Th2, dentre outras, poderiam elevar a atividade imunossupressiva ou imunoestimulatória das mesmas, respectivamente. Acredita-se que esta retro sinalização parácrina e autócrina, entre MSCs e o nicho, sejam responsáveis pelos dados experimentais de reparação tecidual obtidos em animais (CAPLAN *et al.*, 2006; MEIRELLES *et al.*, 2008; SONG, SCHOLTEMEIJER, DE LUCA *et al.*, 2019; SHAH, 2020).

A interação destas células com o nicho de coleta, também poderia explicar os variados perfis imunofenotípicos identificados *in vitro*, em diversos estudos em seres humanos e animais (ZHANG *et al.*, 2011; DA ROCHA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2019; UTUMI *et al.*, 2021). Cada subpopulação/linhagem de MSC (adipoderivadas, estromais medulares, de polpa dentária, etc), de diferentes tecidos adultos, apresentam perfis imunofenotípicos distintos, compartilhando alguns marcadores de superfície (*clusters of differentiation*) e exibindo outros distintos entre si (COVAS, 2006; DOMINICI *et al.*, 2006). Atualmente, as buscas para compreender a relação entre estas diferentes subpopulações e o efeito biológico de diferentes expressões de perfis imunofenotípicos está em ascensão, demandando mais pesquisas neste campo da identidade de MSCs (TAN *et al.*, 2020; TYURIN-KUZMIN *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços na compreensão da biologia das MSCs, é importante destacar que as características manifestadas *in vitro* podem não refletir precisamente seu comportamento *in vivo* (DIMARINO *et al.*, 2013; MORETTA *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016). O comportamento das MSCs em seu ambiente nativo permanece em estudo, e pesquisas atuais enfatizam a necessidade de investigar a plasticidade dessas células *in vitro*. Estudos contemporâneos sugeriram que os ensaios atuais de plasticidade *in vitro* não representam o melhor método para investigação de sua plasticidade e a expressão gênica de MSC tornou-se então um tema relevante de discussão atual (SCHULTZ, SINCLAIR, 2016; ZOŁOCIŃSKA, 2018).

Neste contexto, dada a relevância da compreensão do real potencial de plasticidade entre diferentes subpopulações/linhagens de MSCs, a presente dissertação tem como objetivo comparar a expressão de alguns genes relacionados à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica antes e após a indução de diferenciação *in vitro* em MSCs oriundas da medula óssea (BM MSC) e tecido adiposo (ADSC) subcutâneo murino.

Esta dissertação está estruturada em Introdução geral, revisão de literatura, manuscrito nas normas do periódico PLOS ONE (com imagens em inglês), considerações finais e apêndices (dados brutos da pesquisa e análises estatísticas).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Identidade de MSCs

Antes de sua nomenclatura atual, as MSCs foram relatadas pela primeira vez em 1968, quando Tavassoli e Crosby, em seus estudos sobre o transplante de medula óssea para locais extracelulares, observaram que fragmentos autólogos da medula foram capazes de gerar osso heterotrópico (TAVASSOLI, CROSBY, 1968). Mais tarde, Alexander Friedenstein e

colaboradores, em 1970, realizaram uma descoberta significativa ao identificar que uma subpopulação de células estromais, inicialmente chamadas de “*unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F)*”, possuíam elevado potencial replicativo (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN, LALYKINA, 1970). Posteriormente, Caplan em 1991, cunhou o termo “células-tronco mesenquimais” baseado no pressuposto de que tais células se comportariam *in vivo* como progenitores multipotentes, pois já havia sido demonstrada a indução de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro* (CAPLAN, 1991).

Desde então, as pesquisas sobre “células-tronco mesenquimais” expandiram-se, revelando sua presença em uma variedade de tecidos e órgãos, como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária e placenta (JONES *et al.*, 2002; HANIFFA *et al.*, 2007; FRASER *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2013). Além disso, descobriu-se que estas células possuíam capacidade notável de se diferenciar em algumas linhagens celulares *in vitro* incluindo osteócitos, condroblastos, adipócitos, células musculares, entre outras (GRIGORADIS, HEERSCHE, AUBIN, 1988; CHENG *et al.*, 1994; PITTENGER *et al.*, 1999; ZUK *et al.*, 2001).

No entanto, a nomenclatura das MSCs tem sido objeto de debate e confusão na literatura científica. Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs a alteração do termo “células-tronco mesenquimais” para “células estromais mesenquimais” para refletir melhor sua origem mesenquimal e suas propriedades estromais (DOMINICI *et al.*, 2005). Essa mudança de terminologia visava também evitar confusões com células-tronco embrionárias e células do tecido mesenquimal, o que levou esses pesquisadores a estabelecerem critérios mínimos para definir células estromais mesenquimais multipotentes humanas. Segundo a ISCT, estas deveriam ser aderente ao plástico quando mantido em condições de cultura padrão, expressar CD105, CD73 e CD90, não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR e por fim, exibirem diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, demonstrado por coloração da cultura celular *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2005).

No entanto, alguns pesquisadores encontraram semelhanças entre “células-estromais mesenquimais” e pericitos *in vitro* em múltiplos órgãos humanos (BRACHVOGEL *et al.*, 2005; SACCHETTI *et al.*, 2007; CRISAN *et al.*, 2008) fomentando a hipótese de que existiria um “ancestral” das MSCs na parede de vasos sanguíneos. Tal hipótese corroborava com estudos de Meirelles, Caplan e Nardi em 2008, os quais reuniram um compilado de evidências que demonstram a localização perivascular destas células e propuseram ser esta a seja a razão das

semelhanças identificadas entre estas células, coletadas de tecidos distintos (MEIRELLES, CAPLAN, NARDI, 2008).

Partindo desse pressuposto, todos os tecidos vascularizados poderiam ser uma fonte viável de “células estromais mesenquimais” o que também explicaria seu potencial imunomodulatório demonstrado em diversas pesquisas (KRAMPERA *et al.*, 2003; CONNICK *et al.*, 2012; MELIEF *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019). A função moduladora destas células começou a ser investigada ainda na década de 90, quando Haynesworth e colaboradores em 1996, documentaram que progenitores recém comprometidos sintetizavam um amplo espectro de fatores de crescimento e citocinas com efeitos nas células circunvizinhas (HAYNESWORTH, BABER, CAPLAN, 1996). Mais tarde, MIN e colaboradores em 2002, assim TANG e colaboradores em 2004, elencaram informações sobre os efeitos tróficos mediados por MSCs. Nestes estudos, demonstraram que estas células secretam fatores bioativos *in vitro* e que podem suprimir o sistema imune, inibir a fibrose e apoptose e aumentar a angiogênese (MIN *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2004).

Assim, devido a tais características imunomodulatórias, Caplan (2010) sugeriu a mudança de nome de “células estromais mesenquimais” para “células sinalizadoras medicinais” (MSC), já que sua função *in vivo* provavelmente não estaria ligada à aparente multipotência demonstrada *in vitro*, mas sim à liberação de agentes bioativos imunomoduladores. Tal sugestão tornou-se ainda mais relevante quando Caplan e Correa, em 2011, reuniram informações sobre o potencial imunomodulador destas células, as quais possivelmente atuariam como “drogarias” para reparação da injúria tecidual ao nicho ao qual estão inseridas *in vivo* (FIGURA 1). (CAPLAN, CORREA, 2011)

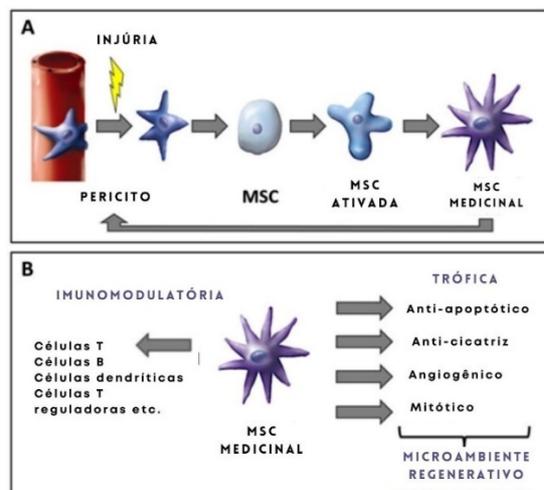


FIGURA 1 – Representação esquemática da provável função das células sinalizadoras medicinais (MSC) *in vivo*. A: Pericitos são estimulados pela injúria tecidual a migrarem e diferenciarem-se em MSCs. B: interação entre MSCs e células do sistema imunológico, e os fatores tróficos produzidos pela mesma. FONTE: Modificado de CAPLAN, CORREA (2011, p. 14).

Desde então, foi sugerido por Caplan que os termos “células-tronco mesenquimais” e “células estromais mesenquimais” entre em desuso, pois células-tronco são células indiferenciadas e não-especializadas capazes de realizar mitoses simétrica e assimétrica por tempo indeterminado, preservando suas propriedades biológicas (CAPLAN, 2017). Assim, o termo “célula-tronco” não pode ser referido às MSCs já que estas não são capazes de formar tecidos *in vivo*, bem como o termo “mesenquimais”, pois este designa um tecido conjuntivo embrionário transitório oriundo do mesoderma e da crista neural de origem ectodérmica, não sendo possível haver uma célula-tronco pós natal com capacidade de formar outros tecidos se não os comprometidos com sua linhagem (ROBEY, 2017).

Além disso, as MSCs não apresentam marcadores imunofenotípicos específicos (ALHADLAQ, MAO, 2004; NARDI *et al.*, 2006), sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um amplo perfil de marcadores positivos e negativos. Essa imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular, conforme demonstrado em estudos contemporâneos (NARDI *et al.*, 2006; LOJUDICE, 2008).

A população de MSCs isoladas da medula óssea de humanos e camundongos comumente expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA-β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1(estroma de suporte da hematopoese) e Sca-1 (GRONTHOS *et al.*, 2003; KOLF *et al.*, 2007; PHINNEY, PROCKOP, 2007).

Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as MSCs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais, como, por expemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mieloides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas) (PHINNEY, PROCKOP, 2007). A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas (KOLF *et al.*, 2007).

Do mesmo modo, para cumprir o requisito de MSC, as células devem exibir plasticidade *in vitro*. Esta é definida como a capacidade das MSCs de originarem diferentes tipos celulares (DOMINICI *et al.*, 2006). Segundo conceito mais recente, a plasticidade refere-se à capacidade de uma determinada célula de um tecido ou órgão específico adquirir o fenótipo de outra célula

de um tecido ou órgão diferente ou até mesmo alternar entre as linhagens mesodérmicas, ectodérmicas, da crista neural e endodérmica (YODER, 2004). A diferenciação das MSCs *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica demonstradas por coloração é o método convencional e recomendado pela ISCT para demonstrar sua plasticidade. Para tanto, utiliza-se de corantes específicos para visualizar características morfológicas distintas das células diferenciadas (DOMINICI *et al.*, 2006). Por exemplo, o vermelho de alizarina é usado para detectar a formação de matriz mineralizada em células osteogênicas, o *Oil Red O* é utilizado para identificar gotículas lipídicas em células adipogênicas, e o *alcian blue* é usado para detectar a produção de matriz cartilaginosa em células condrogênicas (ZOŁOCIŃSKA, 2018).

2.2 Plasticidade de MSC

Com o crescente interesse no uso terapêutico das MSCs, tornou-se crucial identificar os marcadores genéticos que indicam suas características. O perfil genômico permite a identificação e caracterização das MSCs, bem como a descoberta de biomarcadores e moléculas-chave envolvidas em seus processos celulares. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de abordagens de engenharia de tecidos baseadas em células e para aprimorar as aplicações clínicas das MSCs (ALMALKI, AGRAWAL, 2016).

Para investigar os marcadores genéticos das MSCs, uma variedade de técnicas genômicas e de expressão gênica são utilizadas incluindo microarranjos de DNA, sequenciamento de nova geração (NGS), análise de expressão gênica por qPCR e estudos de vias de sinalização celular (KUBO *et al.*, 2009; CAMARILLO *et al.*, 2011; ZOŁOCIŃSKA, 2018; BAEK *et al.*, 2022). Através dessas abordagens, é possível identificar genes expressos durante a diferenciação das MSCs em linhagens celulares *in vitro*, bem como caracterizar os perfis de expressão gênica associados a diferentes estágios de desenvolvimento e condições patológicas. Por exemplo, genes como RUNX2, COL1A1 e OXTERIX (Sp7) são frequentemente associados à diferenciação osteogênica, enquanto PPAR γ , FABP4 e LPL são relacionados à adipogênese. Além disso, genes como SOX9, ACAN e COL2A1 são indicativos da diferenciação condrogênica (QI *et al.*, 2003; HAMID *et al.*, 2012; GRANALI *et al.*, 2014; ZOŁOCIŃSKA, 2018).

Pesquisas contemporâneas têm proposto que a diferenciação das MSCs pode ser influenciada por três principais vias: fatores químicos, fatores físicos e fatores biológicos (YANG *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2016; WILEMS *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2020) (FIGURA 2). Segundo estes autores, os fatores químicos desempenham um papel crucial na orientação da

adipogênese e osteogênese das MSCs em cultura, regulando a atividade de fatores de transcrição-chave durante a diferenciação celular. Além disso, no ambiente *in vivo*, a provável diferenciação das MSCs também pode ser afetada por fatores físicos presentes no nicho tecidual. A determinação do potencial de diferenciação das MSCs recém-isoladas é realizada por meio de ensaios estabelecidos que utilizam um meio de cultura contendo vários produtos químicos. No caso da diferenciação adipogênica, as MSCs são cultivadas em um meio suplementado com isobutilmetilxantina (IBMX), indometacina, dexametasona (Dex) e insulina. O IBMX e o Dex desempenham um papel crucial no início da diferenciação adipogênica (CHEN *et al.*, 2016).



FIGURA 2 – Múltiplos fatores que controlam a provável diferenciação de células sinalizadoras medicinais, incluindo fatores químicos, físicos e biológicos. FONTE: Modificado de CHEN *et al* (2016, p. 1133).

Assim, um estudo evidenciou que no processo da provável diferenciação celular das MSCs é necessária a alteração do estado metabólico destas células, incluindo o teor de oxigênio (TYURIN-KUZMIN *et al.*, 2020). Quando estas são cultivadas *in vitro*, o nível total do metabolismo de produção de lactato e consumo de oxigênio pela célula diminui consideravelmente. Um exemplo disto está no processo de indução de diferenciação adipogênica, onde passam da produção glicolítica de ATP para a fosforilação oxidativa, enquanto em condições de hipóxia, a diferenciação adipogênica é suprimida (ATASHI, MODARRESSI, PEPPER, 2015). De forma similar, a indução de diferenciação osteogênica e condrogênica também são dependentes da via metabólica. O tecido cartilaginoso retém a via glicolítica como principal produção de ATP, isto pode ser justificado pela escassa vascularização da cartilagem, ao contrário da diferenciação osteogênica, pois nesta acredita-se que no processo inicial de diferenciação, a via glicolítica é predominante e no estágio final, a fosforilação oxidativa é priorizada (SHUM *et al.*, 2015).

Por outro lado, fatores físicos também poderiam ser responsáveis por influenciar a diferenciação das MSCs. Devido a sua localização perivascular, estando presente em diversos tecidos, podem interagir fisicamente com os componentes do microambiente. Desse modo, a forma da célula, matrix extracelular e forças mecânicas externas poderiam regular o comprometimento da linhagem de MSCs (CHEN *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou que um substrato mais rígido tem sido associado à promoção da osteogênese, enquanto um substrato mais macio favorece a adipogênese (SHIH *et al.*, 2011). Isso ocorre porque a rigidez do substrato afeta a conformação celular, a organização do citoesqueleto e a ativação de vias de sinalização que desencadeiam a expressão de genes específicos de cada linhagem celular (MCBEATH *et al.*, 2004; SEN *et al.*, 2014)

Outros fatores biológicos têm sido descritos como influenciadores no processo de diferenciação das MSCs. Segundo Schultz e Sinclair (2016), o envelhecimento poderia alterar a plasticidade e imunofenótipo das células ao longo dos anos. Sun e colaboradores (2006) através de análise proteômica, estudaram os efeitos da senescência na diferenciação osteogênica das MSCs e identificaram perda do potencial osteogênico relacionado à idade nestas células. Nesse sentido, é de suma importância entender as etapas do processo que levam uma célula a diferenciar-se em uma de linhagem específica. Atualmente, a hipótese mais debatida em artigos na temática é que talvez as MSCs não sejam células-tronco e que sua plasticidade *in vitro* não corresponde aquelas demonstradas *in vivo* (ROBEY, 2017). Por este motivo a compreensão de real expressão gênica poderia contribuir para elucidar tal relevante questão.

A diferenciação é um processo em etapas, envolvendo diversas vias metabólicas (TAN *et al.*, 2020). Na diferenciação adipogênica, por exemplo, a primeira etapa envolve a ativação da proteína β CCAAT/intensificadora de ligação (C/EBP β) e C/EBP δ . Esses fatores de transcrição estimulam a expressão do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), considerado o principal regulador da adipogênese (AMABLE *et al.*, 2014; CASADO-DÍAZ *et al.*, 2017). O PPAR γ promove a expressão de genes envolvidos no metabolismo e armazenamento de lipídios, incluindo proteína de ligação a ácidos graxos 4 (FABP4), adiponectina (ADIPOQ) e lipoproteína lipase (LPL). Além disso, o PPAR γ também ativa a expressão de C/EBP α , o que aumenta ainda mais a diferenciação e maturação dos adipócitos. Outro fator importante na adipogênese é a insulina, que promove a captação de glicose e a síntese de triglicerídeos nos adipócitos. A insulina também ativa a expressão do PPAR γ , que por sua vez aumenta a expressão de genes envolvidos na diferenciação e maturação dos adipócitos (FIGURA 3) (CHEN *et al.*, 2016).

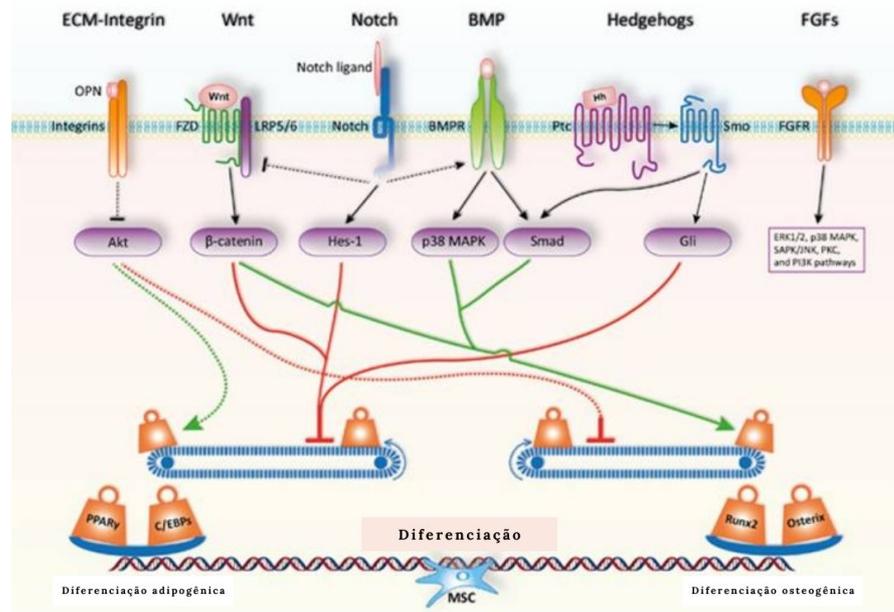


FIGURA 3 - Vias de sinalização e fatores chave de transcrição na regulação da diferenciação adipo-osteogênica de células sinalizadoras medicinais. FONTE: Modificado de CHEN *et al* (2016, p. 1130)

Além desses fatores, outras vias de sinalização também desempenham um papel na diferenciação dos adipócitos. Por exemplo, a via de sinalização do cAMP é ativada pela isobutilmetilxantina (IBMX), que leva à fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP (CREB) e à regulação positiva da expressão de C/EBP β . (BRINDLE *et al.*, 1992; PITTENGER *et al.*, 1999)

A expressão de microRNAs (miRNAs) também desempenha um papel na adipogênese. Por exemplo, miR-431 demonstrou inibir a diferenciação de adipócitos ao direcionar PPAR γ e C/EBP α , respectivamente. Por outro lado, o miR-17-5p demonstrou promover a diferenciação de adipócitos ao direcionar os inibidores da via de sinalização Wnt (WANG *et al.*, 2018).

Para a diferenciação osteogênica, a expressão de genes específicos é regulada positivamente enquanto outros são regulados negativamente, levando à ativação de fatores de transcrição específicos de osteoblastos (CHEN *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2020). Dentre estes, um dos principais reguladores da diferenciação osteoblástica é o fator de transcrição runt-related 2 (RUNX2), também conhecido como fator de ligação ao núcleo alfa-1 (CBFA1) (KATAGIRI, TAKAHASHI, 2002). O RUNX2 ativa a expressão de genes específicos de osteoblastos, como fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) e colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1), que são cruciais para a formação e mineralização da matriz óssea (FARSHDOUSTI *et al.*, 2015).

Além do RUNX2, outros fatores de transcrição estão envolvidos na diferenciação osteoblástica. Osterix (OTX), também conhecido como Sp7, é um fator de transcrição contendo dedo de zinco que atua a jusante do RUNX2 e é necessário para a maturação e função dos osteoblastos. OSX regula diretamente a expressão de vários genes específicos de osteoblastos, incluindo osteopontina (OTP) e sialoproteína óssea (IBS), os quais estão envolvidos na maturação e mineralização da matriz óssea (ZAINAL *et al.*, 2022).

Várias vias de sinalização contribuem para a regulação da diferenciação osteoblástica, como a via de sinalização Wnt/ β -catenina canônica, por exemplo. A ativação dessa via leva à estabilização e à translocação nuclear da β -catenina, que então interage com os membros da família de fatores de transcrição do fator de células T/fator de intensificação linfóide (TCF/LEF). Juntos, os fatores de transcrição β -catenina e TCF/LEF ativam a expressão de genes osteogênicos, incluindo o RUNX2 (FIGURA 3) (CHEN *et al.*, 2016; ZAINAL *et al.*, 2022).

Outra importante via de sinalização envolvida na diferenciação osteoblástica é a via da proteína morfogenética óssea (BMP). As BMPs se ligam aos seus receptores (BMPRs), levando à ativação de cascatas de sinalização a jusante, incluindo as proteínas Smad, uma família de proteínas que atuam como principais transdutores de sinais para receptores da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Esses Smads ativados se translocam para o núcleo e cooperam com outros fatores de transcrição, como o RUNX2, para induzir a expressão gênica específica do osteoblasto (FIGURA 3) (CHEN *et al.*, 2016).

O processo de condrogênese é iniciado pela regulação positiva de diversos fatores de transcrição. Um dos reguladores centrais é o fator de transcrição SRY-box 9 (SOX9), considerado o principal regulador da condrogênese. SOX9 é responsável pela expressão de outros genes condrogênicos, incluindo colágeno tipo II alfa 1 (COL2A1), agrecano (ACAN) e proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP). Esses genes são essenciais para a síntese de componentes da matriz extracelular específicos da cartilagem (MAZOR *et al.*, 2022).

Além disso, a região determinante do sexo Y-box 5 (SOX5) e a região determinante do sexo Y-box 6 (SOX6) são co-reguladores do SOX9 e aumentam sua atividade. Juntos, esses fatores de transcrição promovem a expressão de genes específicos da cartilagem e a manutenção do fenótipo dos condrócitos (LIU *et al.*, 2017).

Várias vias de sinalização também estão implicadas na diferenciação condrogênica. Uma das vias mais importantes é a via de sinalização do fator de crescimento transformador beta

(TGF- β). Os ligandos TGF- β ligam-se aos seus receptores, levando à ativação de efetores a jusante, incluindo as proteínas Smad. Os Smads ativados se translocam para o núcleo e cooperam com outros fatores de transcrição, incluindo SOX9, para promover a condrogênese (WANG *et al.*, 2014).

Outra via crucial envolvida na diferenciação condrogênica é a via da proteína morfogenética óssea (BMP). As BMPs ligam-se aos seus receptores e ativam as proteínas Smad, que, de forma semelhante à sinalização do TGF- β , se translocam para o núcleo e regulam a expressão de genes condrogênicos (SAMSA W., ZHOU X., ZHOU G., 2017).

Além dos fatores de transcrição e vias de sinalização, a composição e as propriedades mecânicas da matriz extracelular (MEC) também desempenham um papel na diferenciação condrogênica. A presença de moléculas específicas da MEC, como colágeno tipo II, agrecan e fibronectina, fornece um microambiente de suporte para o desenvolvimento de condroblastos e deposição de matriz de cartilagem (WANG *et al.*, 2014).

2.3 Imunomodulação

A interação entre MSCs e células imunes ocorre por meio de vários mecanismos, incluindo o contato célula a célula e a secreção de fatores solúveis (secretomas) (HARRELL *et al.*, 2019). Na imunidade adaptativa, as MSCs exercem efeitos imunomoduladores principalmente por meio do contato direto célula-célula e da atividade parácrina, podendo se ligar fortemente às células T através de suas moléculas de adesão, afetando assim a proliferação, ativação e diferenciação das células T (SONG, SCHOLTEMEIJER, SHAH, 2020).

Além disso, possuem moléculas de adesão em sua superfície celular, como integrinas, selectinas e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que lhes permite interagir fisicamente com células imunes. Esse contato direto célula a célula pode ocorrer em vários contextos, inclusive em tecidos inflamados ou dentro de órgãos linfóides (ZHOU *et al.*, 2019).

As MSCs expressam moléculas de superfície como o ligante de morte programada 1 (PD-L1), que interage com os receptores de morte programada-1 (PD-1) nas células T, levando à supressão da ativação e proliferação das células T. Essa interação promove a geração de células T reguladoras (Tregs), que ajudam a manter a tolerância imunológica e a regular as respostas imunes (FIGURA 4) (SONG, SCHOLTEMEIJER, SHAH, 2020).

As MSCs expressam moléculas de superfície como o ligante de morte programada 1 (PD-L1), que interage com os receptores de morte programada-1 (PD-1) nas células T, levando à

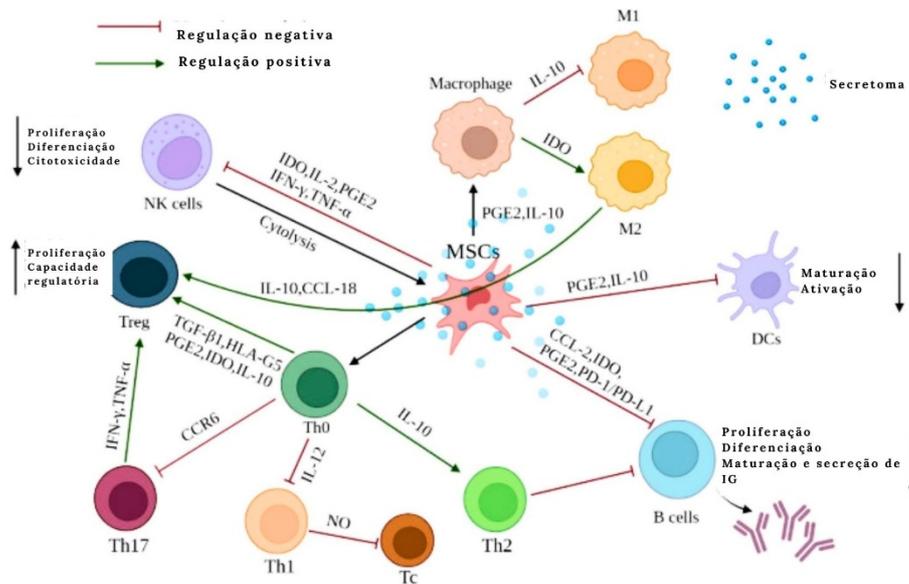


FIGURA 4 - O efeito da imunomodulação mediada por células sinalizadoras medicinais em células imunes.
 FONTE: Modificado de HUANG, WU, TAM (2022).

supressão da ativação e proliferação das células T. Essa interação promove a geração de células T reguladoras (Tregs), que ajudam a manter a tolerância imunológica e a regular as respostas imunes (SONG, SCHOLTEMEIJER, SHAH, 2020).

Desta forma, as MSCs podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, e citocinas anti-inflamatórias, como TGFβ, quimiocinas e outros fatores, como Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (bFGF), Fator de crescimento epidérmico heparina (hEGF), Fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (FIGURA 4) (POGGI, ZOCHI, 2018). Além disso, as MSCs podem modular a resposta imune e promover o reparo de danos inflamatórios por meio da interação com células imunes inatas, como inibindo a proliferação, diferenciação e ativação de células natural killers (NK) através de uma redução na ativação de receptores como NKG2D, NKp30 e NKp44 (HUANG, WU, TAM, 2022). As MSCs afetam a diferenciação de macrófagos principalmente por meio da secreção de citocinas solúveis. Esse mecanismo está relacionado principalmente à atividade da indoleaminodioxigenase 1 (IDO1) e à ligação entre os receptores PGE2 e EP2/EP4 na superfície dos macrófagos (FIGURA 4). Além disso, as MSCs podem secretar o gene 6 estimulado por TNF (TSG-6) e inibir a resposta inflamatória (SPAGGIARI *et al.*, 2008).

Em células dendríticas (DC), as MSCs podem restringir a diferenciação e a maturação das mesmas. As MSCs também podem transformar as DCs em um fenótipo anti-inflamatório e tolerante, regulando negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a produção de células T reguladoras (Tregs) (CASTRO-MANRREZA, MONTESINOS, 2015).

3. CAPÍTULO I

O TECIDO DE ISOLAMENTO INFLUENCIA O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS SINALIZADORAS MEDICINAIS (MSC)*

* Manuscrito elaborado de acordo com as normas do periódico “PlosOne” (Fator de impacto: 3,752, ISSN: 1932-6203)

1 O tecido de isolamento influencia o perfil de expressão gênica de células sinalizadoras
2 medicinais (MSC)

3

4 Ana Gabriellen Sousa do Nascimento¹, Napoleão Martins Argôlo Neto^{1*}

5

6

7

8 ¹ Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional-
9 PPGTAIR, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

10

11

12 *Autor correspondente

13 E-mail: argolo_napoleao@ufpi.edu.br (NMAN)

14

15 RESUMO

16 A evolução da compreensão sobre a origem e identidade de células sinalizadoras medicinais
17 (MSC) tem levado a uma nova perspectiva sobre suas funções e aplicações terapêuticas. Desta
18 forma, o presente artigo tem como objetivo comparar a expressão de alguns genes relacionados
19 à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica antes e após a indução de
20 diferenciação *in vitro* em MSCs oriundas da medula óssea (BMMSC) e tecido adiposo (ADSC)
21 subcutâneo murino. Para isto, as células foram coletadas da medula óssea e do tecido adiposo
22 subcutâneo, isoladas e cultivadas até a terceira passagem sob condições controladas de CO₂ e
23 temperatura. Foram realizados ensaios de prolifricidade por *Scratch Wound Healing*,
24 imunofenotipagem para os anticorpos CD90, CD45, CD105 e CD14, ensaio de plasticidade
25 através da indução à diferenciação *in vitro* e análise de expressão gênica por técnica de qPCR
26 para os genes: OTP, IBS, BMP2 e OTX para linhagem osteogênica; LPL e ADIPOQ para
27 linhagem adipogênica; COLL II e ACCAN para linhagem condrogênica. Sob as condições
28 experimentais do presente estudo, o tecido de origem de coleta exerceu efeito sobre a expressão
29 da maior parte dos marcadores de diferenciação mesenquimal. As BMMSCs indiferenciadas
30 apresentaram maior expressão *in vitro* dos genes associados às linhagens osteogênica,
31 condrogênica e adipogênica, mas não se evidenciou expressão gênica típica de osteoblastos e
32 adipócitos em BMMSCs diferenciadas. A expressão gênica relacionada a condrogênese foi
33 considerada inconclusiva, não sendo possível afirmar, com segurança, se houve ou não
34 diferenciação verdadeira. A expressão tanto de marcadores considerados fatores de transcrição
35 ou de crescimento indutores de diferenciação, denotam o provável potencial modulador *in vitro*
36 de BMMSCs e ADSCs para as diferenciações mesenquimais estudadas.

37

38

39 INTRODUÇÃO

40 Nas últimas décadas, as células sinalizadoras medicinais (MSCs) [1], também conhecidas como
41 "células estromais" ou "células-tronco mesenquimais" [2], têm recebido um interesse
42 significativo na pesquisa científica. A evolução da compreensão sobre a origem e identidade
43 dessas células tem levado a uma nova perspectiva sobre suas funções e aplicações terapêuticas
44 [3]. Inicialmente, as MSCs foram consideradas células progenitoras somáticas, atribuindo-lhes
45 a capacidade de diferenciação e manutenção celular dos tecidos somáticos mesenquimais e não
46 mesenquimais [4,5]. No entanto, a identificação da produção de inúmeros peptídeos bioativos
47 em linhagens de MSCs, associado a descoberta de sua localização perivascular em vários
48 tecidos adultos indicou que, provavelmente, a principal função dessas células não seja
49 diferenciação, mas sim a modulação da resposta inflamatória local e à promoção da homeostase
50 tecidual [6,7].

51 Dessa forma, propôs-se que as MSCs provavelmente constituem-se num fenótipo de células
52 pericito, podendo ser consideradas, hipoteticamente, como pericitos ativados [2,8]. Dessa
53 forma, podem ser isoladas de qualquer tecido vascularizado e provavelmente comportam-se *in*
54 *vivo* como sentinelas do microambiente local [9].

55 A interação entre as MSCs e o nicho anatômico em que estão inseridas desempenha um papel
56 crucial na regulação da atividade imunomoduladora dessas células. Isto poderia explicar, em
57 parte, os variados perfis imunofenotípicos identificados *in vitro*, em diversos estudos em seres
58 humanos e animais. Cada subpopulação/linhagem de MSCs (adipoderivadas, estromais
59 medulares, de polpa dentária, etc), de diferentes tecidos adultos, apresentam perfis
60 imunofenotípicos semelhantes, mas distintos, compartilhando alguns marcadores de superfície
61 (*clusters of differentiation*) e exibindo outros distintos entre si [10,11].

63 Apesar dos avanços na compreensão da biologia das MSCs, inúmeras pesquisas
64 contemporâneas têm demonstrado que as condições de cultivo influenciam o fenótipo e
65 genótipo destas células [12,13]. Assim sendo, o comportamento celular *in vitro* não possui
66 equivalência exata *in vivo* [14–16].

67 Não obstante, a relação entre as diferentes subpopulações/linhagem, sua capacidade de
68 diferenciação *in vitro*, seu imunofenótipo e, subsequentemente, sua expressão gênica ainda são
69 pouco conhecidos, permanecendo relevantes incertezas sobre a real plasticidade das MSCs e o
70 seu potencial terapêutico [17,18].

71 O comportamento das MSCs em seu ambiente nativo permanece em estudo, e pesquisas atuais
72 enfatizam a necessidade de investigar a plasticidade dessas células *in vitro* [14, 16]. Estudos
73 contemporâneos sugeriram que os ensaios atuais de plasticidade *in vitro* não representam o
74 melhor método para investigação de sua plasticidade e a expressão gênica de MSCs tornou-se
75 um tema relevante de discussão atual [19,20].

76 Neste contexto, dada a relevância da necessidade de compreensão do real potencial de
77 plasticidade entre diferentes subpopulações/linhagens de MSCs, o presente artigo tem como
78 objetivo comparar a expressão de alguns genes relacionados à diferenciação osteogênica,
79 condrogênica e adipogênica antes e após a indução de diferenciação *in vitro* em MSCs oriundas
80 da medula óssea (BMMSC) e tecido adiposo (ADSC) subcutâneo murino.

81 MATERIAL E MÉTODOS

82 Delineamento experimental

83 Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x2
84 constituído por quatro tratamentos. O primeiro fator corresponde à origem das MSCs, medula
85 óssea (BMMSC) e tecido adiposo (ADSC) de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). O segundo fator
86 corresponde à condição de diferenciação das MSCs, indiferenciadas e diferenciadas *in vitro*.
87 Para tanto, utilizou-se três ratos como doadores de tecido adiposo subcutâneo e medula óssea.
88 Para cada amostra de tecido foram isoladas e expandidas MSCs, em triplicata, até a terceira
89 passagem (P3), com 10^6 MSCs/passagem, totalizando o n de $6,0 \times 10^6$ MSCs/mL.

90 As amostras de 10^6 MSCs/mL foram distribuídas, em triplicata, de acordo com a origem de
91 obtenção (BMMSC x ADSC). Para cada amostra, foram mensuradas a expressão gênica da
92 “adiponectina (ADIPOQ)”, “expressão gênica da lipoproteína lipase (LPL)”, “expressão gênica
93 da osteopontina (OTP)”, “expressão gênica da sialoproteína óssea (IBS)”, “expressão gênica da
94 proteína central de proteoglicano (ACCAN)”, “expressão gênica do colágeno tipo II (COLII)”,
95 “expressão gênica do fator de transcrição sp7 (OTX)” e “expressão gênica da proteína
96 morfogenética óssea tipo 2 (BMP2)”.

97 Os genes foram selecionados empiricamente, baseado na relevância de suas citações na
98 literatura especializada, constituindo-se entre os genes marcadores de células precursoras (OTX
99 e BMP2) e de células maduras (ADIPOQ, LPL, OTP, IBS, ACCAN, COLII).

100 Animais e aspectos éticos

101 Este estudo obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e
102 foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do

103 Piauí (UFPI) sob o número 662/2020. Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*),
104 machos, com 30 dias de idade, peso médio de $260\text{g} \pm 2,63$, provenientes do Biotério central da
105 UFPI.

106 Os animais foram mantidos em sistema convencional de gaiolas individualizadas, instaladas
107 sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 25°C , mantidos em ciclo claro/escuro
108 de 12h, manejados por tratador do biotério, alimentados com ração específica para roedores e
109 água *ad libitum*. Após a realização do estudo, todos os animais foram eutanasiados, seguindo a
110 Resolução Normativa nº 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do
111 Brasil (CONCEA). Para tanto, foi administrado 10mg/kg de cloridrato de lidocaína 2%
112 (Syntec[®] do Brasil LTDA) e após 10 minutos, administrado 150 mg/kg de tiopental sódico 0,5g
113 (Cristália[®] produtos químicos e farmacêuticos LTDA), ambos intraperitonealmente.

114 **Coleta, isolamento e expansão das células sinalizadoras medicinais**

115 A coleta de medula óssea e tecido adiposo subcutâneo foi realizada conforme descrito
116 anteriormente por ARGÔLO NETO *et al.* [21] COSTA *et al.* (22) respectivamente. De forma
117 sucinta, foram coletadas amostras de três gramas de gordura subcutânea da região cervical
118 dorsal e região inguinal, em ambiente cirúrgico, com auxílio de um bisturi n.24, cabo n.4
119 (Endogerais Medical Commerce[®] LTDA). As amostras foram manipuladas em câmara de fluxo
120 laminar, onde foram lavadas três vezes com PBS 1x, ph 7,2 (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific
121 Inc, catálogo 70013032, 10x, v.500mL), fragmentadas mecanicamente em segmentos de
122 aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$ e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C . O *pellet* obtido
123 foi ressuspensionado em meio de cultivo completo DMEM Glutamax[™] (Gibco[™], Thermo Fisher
124 Scientific Inc, catálogo 10569010, USA) suplementado com 1% de solução de penicilina e
125 estreptomicina (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo 15140122, 10.000U/mL,
126 v.100mL), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo

127 11140050, 100x, v.100mL), 1% de L-glutamina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc,
128 catálogo 25030081, 200nM, v.100mL), 1% de anfotericina B (Gibco™, Thermo Fisher
129 Scientific Inc, catálogo 15290018, 250µg/mL, v.20mL) e 15% de soro fetal bovino (Gibco™,
130 Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo 10500064, v.500mL) e imediatamente semeado em três
131 garrafas de 25cm² contendo dois mL de meio completo.

132 Amostras de medula óssea foram obtidas, mediante técnica de *flushing*. Para tanto, os fêmures
133 foram amputados assepticamente, divulsionados os tecidos adjacentes, seccionadas as epífises
134 ósseas e realizada a lavagem do canal medular (*flushing*) com meio de cultivo completo. Em
135 seguida, a amostra medular total obtida foi filtrada com auxílio de um filtro de células de 70µm
136 (BD Biosciences™, USA) e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* obtido
137 foi ressuspensionado em meio de cultivo completo e imediatamente semeado em três garrafas de
138 25cm² contendo dois mL de meio completo.

139 Todas as garrafas, de ambas amostras, foram mantidas incubadas em estufa incubadora de CO₂
140 (Thermo Fisher Scientific Inc, *jacket water*, série 310) a 5% de CO₂ 37°C e 95% de umidade.

141 As garrafas de cultivo foram avaliadas individualmente a cada 72 horas sob microscopia óptica
142 (Pró-lab Materiais para Laboratório® LTDA) e tripsinizadas quando obtida 80% de confluência.

143 A tripsinização foi realizada conforme descrito por LEITE *et al.* (23) na qual foi adicionada à
144 garrafa dois mL de tripsina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo 25200056, 0,25%,
145 v.500mL), reincubando-a sob as mesmas condições por 10 minutos e inativando a ação
146 enzimática com a adição de quatro mL de meio de cultivo completo. As MSCs em suspensão
147 foram aspiradas assepticamente e expandidas com taxas de repique progressivas 1:2, 1:4, 1:8 e
148 assim, sucessivamente, em garrafas de 25cm².

149 Algumas alíquotas foram selecionadas aleatoriamente para fixação com formoldeído (4%
150 (Quimisul® SC Produtos Químicos e Laboratório, 37%, v.1000mL) e coloração com Giemsa

151 (CasaLab, materiais para laboratórios, Brasil, código 4154, v.1.000mL) para fins de
152 fotodocumentação.

153 **Ensaio de prolifricidade celular**

154 Este ensaio foi baseado na técnica de *Scratch Wound Healing* descrita por WALTER *et al* [24].
155 Resumidamente, alíquotas de MSCs foram plaqueadas, em triplicata, a 1×10^4 células/poço, em
156 placas de cultivo de 96 poços de $0,32 \text{ cm}^2/\text{poço}$. As células foram cultivadas sob as mesmas
157 condições até atingirem confluência de 80%. Em seguida, foi realizada uma lesão linear de
158 2,9mm na monocamada celular, utilizando uma ponteira de micropipeta estéril. As células
159 foram lavadas imediatamente com PBS para remover os debris celulares. A área da lesão foi
160 fotografada com contraste de fase em posições marcadas no microscópio invertido
161 (COLEMAN NIB-100[®]). As células foram mantidas durante 0, 24, 48 e 72 horas e as áreas
162 riscadas mensuradas com o software Image J (NIH, Bethesda[™], USA).

163 **Imunofenotipagem celular**

164 O ensaio foi realizado conforme adaptação da metodologia descrita por LEITE *et al.* [23]. As
165 MSCs em P3 foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS. Em seguida, foi adicionado 0,1ml
166 do tampão DBPS (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo 14190144, 1x, v.500mL)
167 contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich[™], catálogo A905610G),
168 centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, as MSCs foram incubadas com
169 os anticorpos conjugados (diluição 1:100) CD105 (Anti-CD105 PE -Abcam Cambridge, USA);
170 CD14 (Anti-CD45 FITC-Sigma, USA); CD90 (Anti-CD90 APC -Abcam Cambridge, USA);
171 CD45 (Anti-CD45 FITC -Abcam Cambridge, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente.
172 Após a incubação as MSCs foram lavadas uma vez com 0,1 ml tampão FACS e novamente
173 centrifugadas sob as mesmas condições. O *pellet* obtido foi ressuspensado em DPBS e as

174 amostras, analisadas utilizando um citômetro de fluxo FACScanto® II e software BD
175 FACSDiva® software (Version 6.1.3). Como controle (branco) da análise, utilizou-se uma
176 amostra pura de MSCs.

177 **Ensaio de plasticidade celular**

178 O ensaio de plasticidade foi conduzido conforme descrito por ROCHA *et al.* [25]. De forma
179 geral, as MSCs de ambas amostras (ADSC e BMMSC), em P3 foram semeadas, em triplicata,
180 a 1×10^4 células/mL em placa de 96 poços. Para a indução da diferenciação osteogênica as MSCs
181 foram incubadas por 21 dias em meio STEMPRO® *Osteogenesis Differentiation* (Gibco™,
182 Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo A1007201). Posteriormente, o meio de indução foi
183 descartado, as células lavadas com PBS, fixadas em formaldeído tamponado a 4% e coradas
184 com solução de *Alizarin Red* (Sigma-Aldrich™, catálogo A553325G). A diferenciação
185 adipogênica foi realizada mediante incubação das MSCs em meio STEMPRO® *Adipogenesis*
186 *Differentiation* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo A100700) durante sete dias,
187 seguido de fixação em solução de formaldeído a 4% e coradas com *Oil Red O Solution* (Sigma-
188 Aldrich™, 0,5% em isopropanol, catálogo O1391, v.250mL). A indução condrogênica ocorreu
189 mediante incubação das MSCs por 15 dias em meio STEMPRO® *Chondrogenesis*
190 *Differentiation* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc, catálogo A1007101), fixadas em
191 formaldeído a 4% e coradas com solução de *Alcian blue* (Sigma-Aldrich™, 1% e 3% de ácido
192 acético, catálogo B8438, v.250mL). Todas as amostras celulares foram observadas em
193 microscopia óptica convencional para análise qualitativa ou quantitativa.

194 **Extração do RNA e qPCR quantitativo (expressão gênica)**

195 O ensaio foi realizado conforme descrições prévias de FIDELES *et al.* [26]. O RNA total das
196 amostras (MSCs) foi extraído antes e depois da indução de diferenciação celular e identificado
197 como RNA de MSC indiferenciada e RNA de MSC diferenciada em osteoblasto, adipócito ou

198 condrócito. A extração foi realizada utilizando Quikzol[®] (Trizol, Ludwing Biotecnologia[®]
 199 LTDA, v.100mL, lote 08084G), conforme instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade
 200 do RNA extraído foram avaliados por espectrofotometria no Nanodrop 2000 (Thermo Fisher
 201 Scientific Inc, USA).

202 Assim, 1 µg de RNA total de cada amostra foi utilizada para a síntese de cDNA. A reação de
 203 transcrição reversa foi realizada utilizando um kit de síntese de cDNA MMLV transcriptase
 204 reversa (RNase H- Ludwing Biotecnologia[®] LTDA, 200U/mL, lote 2261) de acordo com as
 205 instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C até a realização do
 206 qPCR.

207 Para cada fator de análise (BMMSC x ADSC e indiferenciada x diferenciada), as reações
 208 individuais de qPCR foram preparadas utilizando o kit *Syber Green qPCR Master Mix Low*
 209 *Rox* (Ludwing Biotecnologia[®] LTDA, 25µL) com 420 nM de cada iniciador do gene de
 210 interesse (Tabela 1), 4µl de cDNA da célula de estudo, 6 µl de *SYBR Green Mix* e o volume
 211 final foi ajustado para 12µl com água DEPC (Invitrogen life technologies[®], v.100mL, catálogo
 212 462224).

213 **Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos usadas para análise de qPCR.**

Gene	Sequências sentido e antisenrido 5' - 3'
GAPDH	Forward: AAGATGGTGAAGGTCGGTGT Reverse: GAGGTCAATGAAGGGGTCGT
OTP	Forward: GCACACAAGCAGACGTTTTG Reverse: ATCTGTGGCATCGGGATACT
IBS	Forward: ACAACGAAGACTCTGAGGGG Reverse: CTCCAACCTTCCAGCGTCAG
OTX	Forward: AGCCCTGGGAAAAGGAGG Reverse: GACCATTGGTGCTTGAGAAGG
BMP2	Forward: AGTCCTTCACTGCCAGCACA Reverse: CCTCAGTCCATAAGCCAAGCT
ADIPOQ	Forward: AGGCCGTTCTCTTACCTAC Reverse: TTGTCCCCTTCCCATAACAC
LPL	Forward: CGGCCTCTTCCCCTATCAG Reverse: CAGTGTGCGATCTGGAAGCTG
ACCAN	Forward: GCTACCCTGATCCCTCATCC Reverse: AGGTCACCTGTCTGGATGGTG
COLLII	Forward: CAGCAGGTTACGTACACTG Reverse: CCATGGGTGCAATGTCAACA

214 Como gene constitutivo, utilizou-se o GAPDH. Os controles negativos sem cDNA (NTC)
215 foram incluídos no experimento e as amostras foram testadas em triplicata. As reações foram
216 realizadas no termociclador *StepOne* (Thermoscience, USA) usando a programação: 95°C por
217 10 min, 40 ciclos de 95°C × 15seg, 60°C × 60seg. Em seguida, foi realizado a curva de
218 dissociação (curva de melt).

219 **Análise estatística**

220 O método $2^{-\Delta CT}$ foi utilizado para as análises de expressão relativa e os resultados são
221 apresentados com média e desvio padrão. Os pressupostos de normalidade foram aferidos pelo
222 teste de Shapiro-Wilk. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial inteiramente
223 casualizado, tendo sido avaliado duas origens (BMMSC x ADSC) e duas condições de
224 diferenciação (indiferenciada x diferenciada). As médias foram comparadas utilizando teste de
225 tukey ($p \leq 0,05$) (SAS[®] *analytic, North Carolina State University, USA*).

226 **RESULTADOS**

227 **Isolamento e imunofenotipagem celular**

228 Todas as coletas, de ambos os tecidos, permitiram a obtenção de células mononucleares
229 aderentes a partir da primeira semana de cultivo. As células aderentes exibiram morfologia
230 tipicamente fusiforme, organizando-se em pequenas colônias (*clusters*) com aproximadamente
231 seis a oito células. Estas expandiram-se radialmente, ao longo de 15 dias, em média,
232 coalecendo entre si, formando colônias maiores, a partir de 20 células. A partir de então, as
233 células assumiram morfologia fibroblastóide, com núcleos centralizados esféricos, expandindo-
234 se como uma monocamada homogênea. Não foram identificadas diferenças morfológicas entre
235 as BMMSCs e ADSCs, no mesmo estágio de desenvolvimento (tempo de cultivo) (Fig 1).

236 O perfil imunofenotípico das BMMSCs, submetidas a análise em citômetro de fluxo,
 237 apresentou-se positivo para os anticorpos CD90 (86,8%) e CD105 (54,3%). Não foi observada
 238 marcação para os anticorpos CD45 e CD14. Analogamente, o perfil imunofenotípico
 239 identificado nas ADSCs apresentou marcação positiva para os anticorpos CD90 (91,7%),
 240 CD105 (61,3%) e marcação negativa para os anticorpos CD45 e CD14 (Fig 1).

241 Fig. 1 Células sinalizadoras medicinais (MSCs) de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) oriundas
 242 de medula óssea (BMMSC) e tecido adiposo subcutâneo (ADSC). A: 25 dias de incubação,
 243 apresentando-se predominantemente como células aderentes fibroblastóides. Histograma de
 244 imunofenotipagem em terceira passagem. B a D: BMMSCs. E a H: ADSCs. B: branco, C:
 245 marcação positiva para CD90 (86,8%) e negativa para CD14, D: marcação positiva para CD105
 246 (54,3%) e negativa para CD45. E: branco, F: ausência de marcação para CD14, G: marcação
 247 positiva para CD90 (91,7%) e negativa para CD45, H: marcação positiva para CD105 (61,3%).

248

249

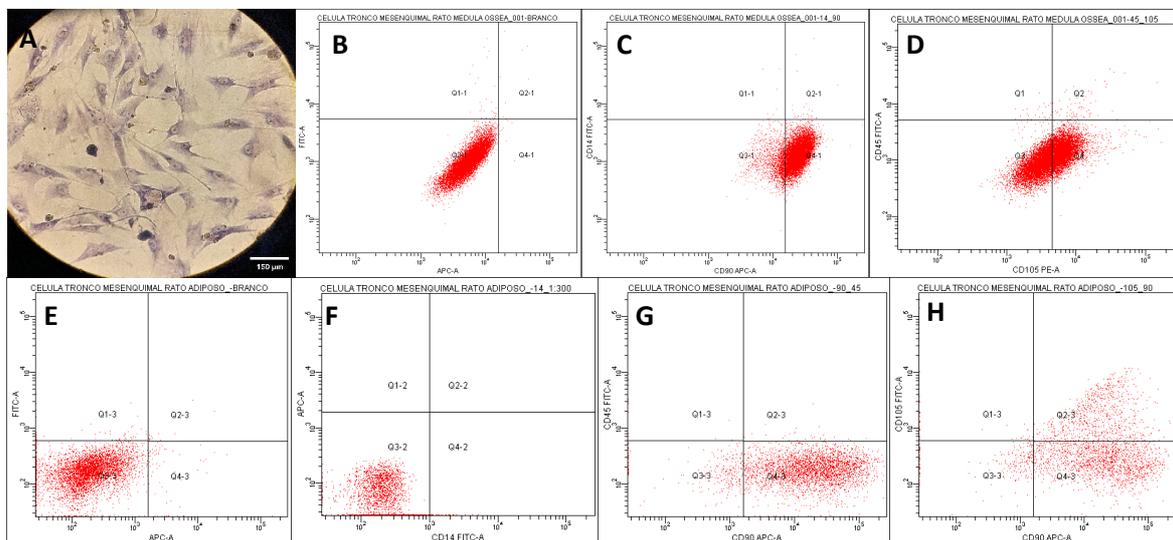
250

251

252

253

254

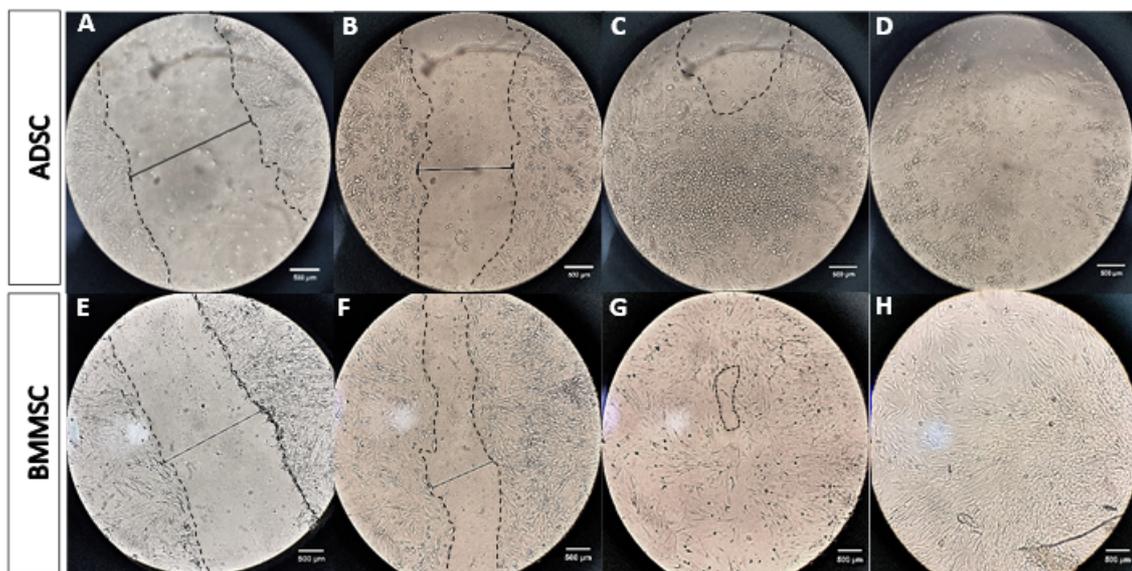


255 Prolifricidade (ensaio de *Scratch Wound Healing*)

256 Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas ($p \geq 0,05$) entre a prolifricidade de
 257 BMMSCs e ADSCs. Identificou-se que as BMMSCs exibiram médias de área de falha

258 discretamente menores que as ADSCs. As BMMSCs exibiram áreas de falhas de $2,6\pm 0,08\text{mm}$
 259 e $1,2\pm 0,7\text{mm}$, $0,06\pm 0,02\text{mm}$ após 12h, 24h e 48h, respectivamente. As ADSCs exibiram áreas
 260 de falhas de $2,8\pm 0,9\text{mm}$ e $1,6\pm 0,2\text{mm}$, $0,3\pm 0,04\text{mm}$, respectivamente aos mesmos intervalos
 261 de tempo. Após 72 horas, tanto as BMMSCs quanto ADSCs preencheram completamente toda
 262 a área de falha, demonstrando ambas, capacidade proliferativa e migratória (Fig 2).

263 Fig. 2 Culturas de ADSC e BMMSC em terceira passagem submetidas a ensaio de Scratch
 264 Wound Healing ao longo de 12 (A e E), 24 (B e F), 48 (C e G) e 72 horas (D e H),
 265 respectivamente. Não foram identificadas diferenças ($p\geq 0,05$) entre as áreas de falha. Ambas
 266 linhagens demonstram capacidade proliferativa para colonizar a área de falha, tendo as
 267 BMMSC apresentando capacidade cinética proliferativa discretamente maior. Barra de escala
 268 $500\ \mu\text{m}$.



269

270 Ensaio de plasticidade celular

271 Obteve-se êxito na indução de diferenciação *in vitro* para ambas as linhagens (BMMSC e
 272 ADSC). Tanto as ADSCs quanto as BMMSCs submetidas à diferenciação adipogênica
 273 apresentaram células arredondadas, com elevada relação núcleo:citoplasma, com citoplasma

274 rico em vacúolos lipídicos evidenciados pela coloração *Oil Red* (Fig 3a,b). Na indução de
 275 diferenciação condrogênica, observou-se matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos,
 276 evidenciados pela coloração *Alcian Blue* (Fig 4a,b). Para a indução de diferenciação
 277 osteogênica, as células de ambas linhagens apresentaram matriz extracelular rica em cálcio,
 278 fortemente evidenciada pela coloração *Alizarin Red* (Fig 5a,b).

279
 280 Fig. 3 Análise da plasticidade e expressão gênica osteogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B
 281 indução adipogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em vermelho indica
 282 presença de matriz extracelular composta por fosfatos de cálcio. Barra de escala 500 μ m. I:
 283 expressão gênica da osteopontina (OTP) e sialoproteína óssea (IBS) de acordo com o fator
 284 origem. II: expressão gênica da proteína morfogenética óssea II (BMP2) e Osterix (OTX) de
 285 acordo com o fator interação entre origem e condição. *Significante ($p \leq 0,05$).

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

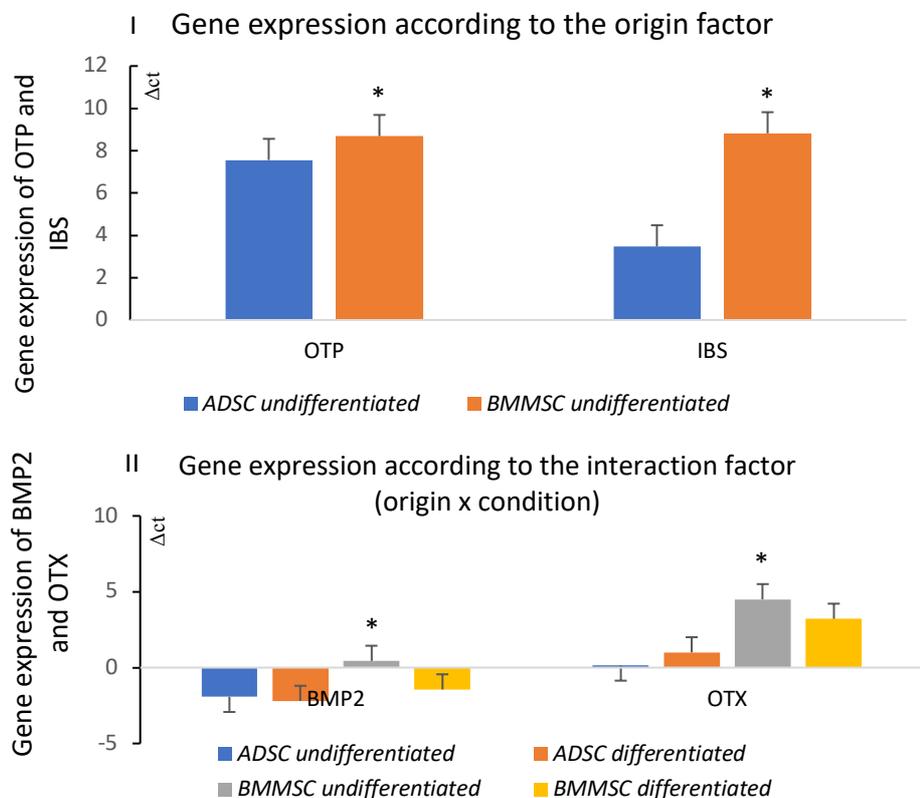
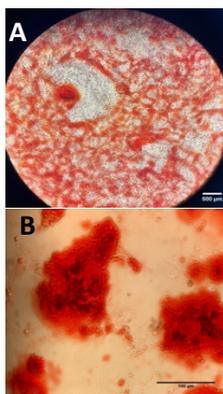
296

297

298

299

300



301 Fig. 4 Análise da plasticidade e expressão gênica condrogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B
 302 indução condrogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em azul indica
 303 presença de matrix extracelular composta de proteoglicanos. Barra de escala 500 μ m. Expressão
 304 gênica de colágeno tipo II (COLII) e proteína central de proteoglicano (ACCAN) de acordo
 305 com o fator interação entre origem e condição. *Significante ($p \leq 0,05$).

306

307

308

309

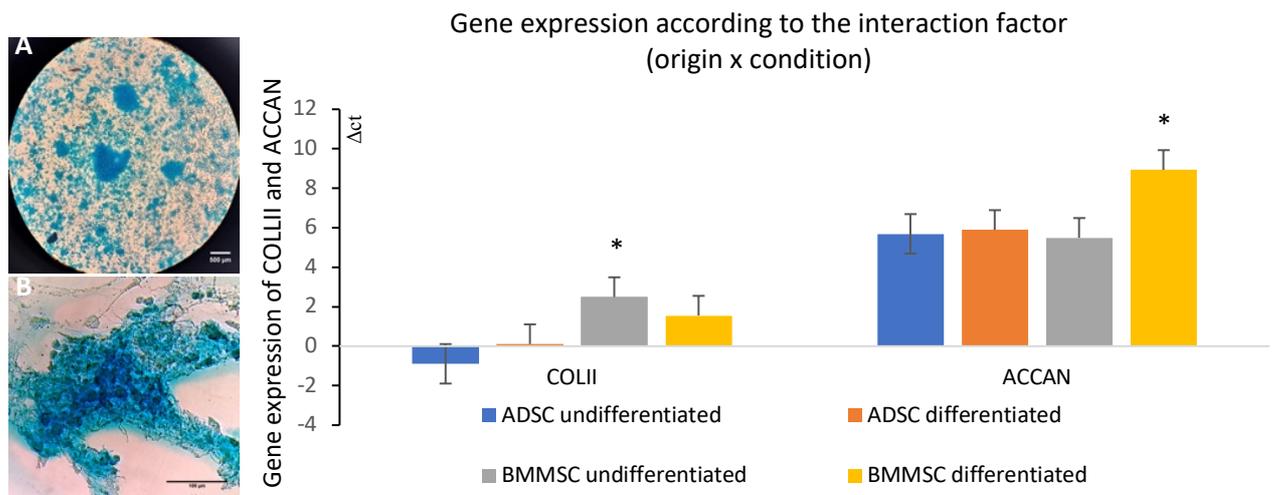
310

311

312

313

314



315

316 Fig. 5 Análise da plasticidade e expressão gênica condrogênica de BMMSCs e ADSCs. A/B
 317 indução adipogênica de BMMSCs e ADSCs, respectivamente. Coloração em vermelho indica
 318 presença de lipídeos nas células. Barra de escala 500 μ m. Expressão gênica de lipoproteína
 319 lipase (LPL) e adiponectina (ADIPOQ) de acordo com o fator interação entre origem e
 320 condição. *Significante ($p \leq 0,05$).

321

322

323

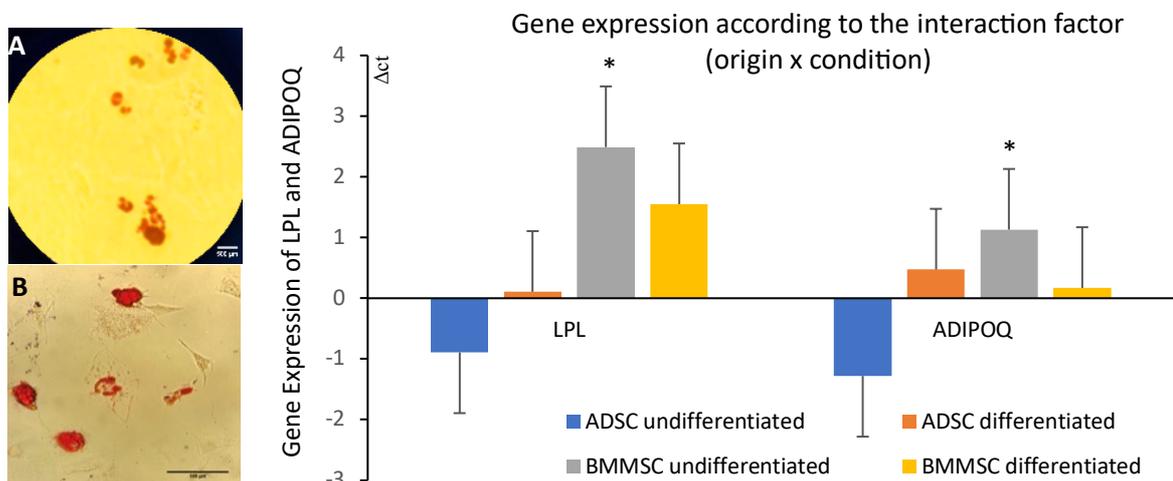
324

325

326

327

328



329 **Expressão gênica**

330 Os resultados de expressão dos genes *OTP*, *IBS*, *BMP2*, *OTX*, *COLLII*, *ACCAN*, *LPL* e
331 *ADIPOQ* nas duas origens (BMMSC x ADSC) e duas condições de diferenciação
332 (indiferenciada x diferenciada) avaliadas, são apresentadas nas figuras 3 I, II, 4 e 5. Observou-
333 se efeito significativo da interação entre origem e condição de diferenciação sobre a expressão
334 dos genes *OTX* ($p=0,0205$), *BMP2* ($p=0,0467$), *COLLII* ($p=<0,0001$), *ACCAN* ($p=0,0006$), *LPL*
335 ($p=0,0001$) e *ADIPOQ* ($p=0,0002$), com maior expressão ($p\leq 0,05$) em BMMSCs
336 indiferenciadas. Apenas a expressão do gene *ACCAN* foi maior ($p\leq 0,05$) em BMMSCs
337 diferenciadas (Fig 4).

338 Os genes *OTP* e *IBS* não apresentaram efeito significativo ($p\geq 0,05$) da interação entre origem
339 e condição de diferenciação. Nestes, a expressão gênica foi influenciada ($p\leq 0,05$) somente pelo
340 fator origem, sendo observada maior expressão em BMMSCs (Fig 3I).

341 **DISCUSSÃO**

342 As MSCs desta pesquisa foram coletadas, isoladas e expandidas de forma usual, conforme
343 amplamente descrito na literatura especializada [27,28] Quando em cultivo, tanto as BMMSCs,
344 quanto ADSCs comportaram-se como esperado, exibindo aderência à superfície de cultivo,
345 capacidade proliferativa e manutenção de fenótipo, conforme também demonstrado em estudos
346 anteriores [29,30]. Independente da origem de isolamento (medula óssea ou tecido adiposo
347 subcutâneo) o fenótipo celular observado foi o mesmo. Inicialmente apresentando-se com
348 morfologia fusiforme e, posteriormente, assumindo características fibroblastóides (Fig 1A e 2).
349 Tal observação reitera a principal hipótese atual para a origem das MSCs, haja visto que
350 pericitos são células mesenquimais e, portanto, com morfologia similar a células musculares e
351 endoteliais [31,32] tal qual observado na morfologia das MSCs desta pesquisa.

352 A manutenção da capacidade proliferativa, mensurada neste estudo por meio do ensaio de
353 *Scratch Wound Healing*, foi observada tanto nas BMMSCs e ADSCs, sem diferenças entre
354 ambas. Embora as BMMSCs tenham exibido capacidade proliferativa e migratória
355 discretamente maior que as ADSCs (Fig 2), ambas colonizaram a área de falha em 72 horas.
356 Esta capacidade inerente de migração e colonização de nichos adjacentes já havia sido
357 demonstrada anteriormente e constitui-se numa característica descrita para MSCs *in vitro* e *in*
358 *vivo* [33].

359 Atualmente acredita-se que, *in vivo*, as MSCs podem ser induzidas a desprenderem-se da região
360 periendothelial e a migrarem para o tecido adjacente por estímulos mecânicos e/ou químicos [12,
361 13]. Sucintamente, de forma geral, segundo estes autores, fatores mecânicos como tensão e
362 alongamento tecidual cíclicos, estimulam as vias de sinalização enzimática da 'quinase de
363 adesão focal' e de 'sinalização extracelular regulada por sinal' (FAK-ERK1/2). Estas induzem
364 à redução do citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, a rigidez celular, favorecendo sua
365 migração. Além disso, também estimulam a liberação da quimiocina pleiotrópica 'fator 1 de
366 células estromais' (SDF-1) pelas células endoteliais e tecidos adjacentes. Como as MSCs
367 expressam níveis variados do receptor CXCR4, cognato ao SDF-1, conseguem migrar através
368 do endotélio para os tecidos alvo. Analogamente, os fatores de crescimento de fibroblastos
369 (bFGF), endotelial vascular (VEGF), de hepatócitos (HGF), semelhante à insulina-1 (IGF-1),
370 derivado de plaquetas (PDGF), crescimento transformador fator β 1 (TGF- β 1), dentre outros,
371 secretados pelo nicho adjacente, podem induzir superexpressão de receptores CXCR4 e
372 favorecer a quimiotaxia de MSCs em direção ao gradiente de SDF-1 liberado pelos tecidos
373 lesionados [34,35].

374 Sob condições *in vitro*, a capacidade de proliferação e migração celular podem ser avaliada pelo
375 tratamento prévio da cultura celular com SDF-1 e/ou fatores de crescimento, induzindo
376 superexpressão de CXCR4 [36]. Contudo, a proliferação celular e migração *in vitro* também

377 podem ser observadas sem nenhum tratamento prévio [37]. Como células perissinusoidais,
378 musculares lisas vasculares e algumas células hematopoiéticas também podem responder
379 positivamente ao tratamento com SDF-1 e fatores de crescimento [33], optou-se por não utilizar
380 nenhum indutor de proliferação e migração celular nas culturas. Assim, demonstramos que
381 constituem-se apenas de MSCs, bem como o potencial idiossincrásico das mesmas para
382 preencher o local de falha no teste de *Scratch Wound Healing*.

383 As BMMSCs e ADSCs exibiram o mesmo imunofenótipo, com intensidades de expressão
384 semelhantes, reiterando a pureza da cultura analisada. Ambas as linhagens exibiram expressão
385 CD90+ e CD105+, com CD14- e CD45- (Fig 1 B-H). Este é um perfil imunofenotípico
386 comumente descrito em estudos com linhagens de MSCs de murinos [38], roedores silvestres
387 [25, 39], animais domésticos [40,41] e humanos [42].

388 Até o momento, não foram descritos marcadores específicos para MSCs. Uma das dificuldades
389 para o estabelecimento de marcadores específicos de MSCs são as possíveis mudanças
390 fenotípicas que podem ocorrer a partir do momento em que as MSCs são coletadas do seu nicho
391 microanatômico *in vivo* e submetidas à cultivo *in vitro* em microambiente artificial. Durante
392 este processo, é possível que marcadores constitutivos expressos *in situ* deixem de ser expressos
393 *in vitro* e/ou que sejam expressos marcadores não constitutivos quando em condição de cultivo
394 [15, 20]. A própria matriz extracelular pode induzir alterações no imunofenótipo de MSCs. Não
395 obstante, diversos trabalhos contemporâneos, utilizando metodologias de cultivo distintas, tem
396 demonstrado diferentes perfis imunofenotípicos, tanto em variedade de marcadores, quanto em
397 intensidade de expressão [43–46]. Por este motivo, a Sociedade Internacional de terapia Celular
398 (ISCT) propôs critérios mínimos para a identificação de linhagens de MSCs, como BMMSCs
399 e ADSC, por exemplo [11]. Segundo a ISCT, culturas de MSC devem expressar CD105, CD90
400 e CD73 e não expressar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-DR [11].

401 O CD90 ou antígeno de diferenciação timócito 1 (Thy-1) é uma proteína de superfície celular
402 expressa por diversas linhagens de células-tronco, bem como por timócitos, células T,
403 neurônios, células '*natural killers*' (NK), células endoteliais, dentre outras [47,48]. É
404 considerado como um relevante marcador de pluripotência, quando associado ao CD34 e de
405 multipotência, isoladamente [49,50]. O CD105 é uma endoglina, uma proteína transmembranar
406 componente do receptor do fator transformador de crescimento- β (TGF β R). A superexpressão
407 do CD105 tem sido demonstrada em células endoteliais vasculares humanas e animais,
408 sobretudo em tecidos inflamados em processo de neovascularização [51]. Como ambos
409 marcadores, CD90 e CD105 são expressos por células endoteliais, parece-nos evidente que,
410 baseado no silogismo que as MSCs poderiam representar um fenótipo de células pericito [1],
411 as BMMSCs e ADSCs os expressariam em níveis significativos, tal qual foi demonstrado neste
412 estudo (Fig 1).

413 Por outro lado, o CD14 é uma glicoproteína expressa na membrana de leucócitos e células não
414 mieloides, podendo ser encontrada tanto na membrana plasmática ancorada por
415 glicosilfosfatidilinositol (GPI), como na forma solúvel no espaço extracelular [52]. O CD45 é
416 uma proteína tirosina fosfatase, receptor tipo C, também conhecida como PTPRC ou antígeno
417 comum leucocitário. É expresso em várias isoformas em todas as células hematopoiéticas
418 diferenciadas [53]. A ausência de expressão de CD14 e CD45 nas BMMSCs e ADSCs
419 cultivadas nesse estudo é uma evidência que não havia contaminantes celulares nas culturas
420 analisadas.

421 Com relação a indução de plasticidade *in vitro*, as BMMSCs e ADSCs exibiram a mesma
422 característica de resposta positiva para as colorações *Alizarin Red S*, *Alcian Blue* e *Oil Red O*,
423 após cultivo em meio indutor de diferenciação (Fig 3a,b, 4a,b, 5a,b). Este resultado indica a
424 aparente capacidade das BMMSCs e ADSCs produzirem, *in vitro*, matriz extracelular rica em
425 cálcio, proteoglicanos, além de vacúolos intracitoplasmáticos de lipídeos, respectivamente.

426 Alguns trabalhos contemporâneos utilizando linhagens de MSCs humanas e animais, de
427 diferentes nichos anatômicos, tem descrito resultados idênticos, sob as mesmas condições [54–
428 56]. Muitos destes, utilizaram o mesmo meio indutor de diferenciação adotado neste estudo
429 [57,58]. Tal fato demonstra que o ensaio de diferenciação *in vitro*, ainda que utilizando meios
430 de indução comerciais, é eficaz em induzir os três fenótipos mesenquimais básicos osteogênico,
431 adipogênico e condrogênico, em BMMSCs e ADSCs. Contudo, tal observação é insuficiente
432 para se afirmar que houve diferenciação ou transdiferenciação celular, conforme já postulado
433 anteriormente [19].

434 Analisando-se os ensaios de diferenciação isoladamente, sabe-se que a reação positiva da
435 coloração *Alizarin Red S* não permite distinção entre calcificação distrófica, induzida por
436 células em processo de necrose ou apoptose, e calcificação viável da mineralização ativa da
437 matriz extracelular [59]. Além disso, células indiferenciadas, incluso células endoteliais em
438 processo de diferenciação, dentre outras, produzem a enzima fosfatase alcalina (FA). Esta
439 enzima cliva o β -glicerolfosfato, componente de todo meio de indução osteogênica, elevando a
440 concentração de fosfato no meio de cultivo e, por seguinte, precipitando o fosfato de cálcio e
441 induzindo reação positiva à coloração *Alizarin Red S* [59]. Contudo, a matriz extracelular
442 formada não se constitui de hidroxiapatita [60]. Tais ressalvas, infelizmente, não são
443 consideradas pela ISCT para demonstração de plasticidade em MSCs, até o momento. Tal
444 condição poderá, inadvertidamente, induzir interpretação equivocada do pesquisador que
445 populações de BMMSCs ou ADSCs, por exemplo, exibem diferenciação osteoblástica *in vitro*,
446 baseando-se apenas na reação de coloração por *Alizarin Red S*.

447 Além disso, fibroblastos maduros tratados *in vitro* com o fator de transcrição da proteína
448 morfogenética óssea (BMP) exibem fenótipo osteogênico temporário com produção de fosfatos
449 de cálcio, mas são incapazes de originar outros osteoblastos, manterem-se como osteoblastos e
450 produzirem matriz mineralizada de hidroxiapatita [61].

451 Ciente de tais limitações, o presente trabalho se propôs também a avaliar a expressão gênica de
452 quatro marcadores de diferenciação osteogênica comumente referidos na literatura
453 especializada [19,46].

454 A OTP, também conhecida como sialoproteína 1 (BSP-1 ou BNSP) ou fosfoproteína secretada
455 1 (SPP1), é uma proteína O-glicosil fosfato (glicoproteína composta por oligossacarídeos),
456 secretada principalmente por osteoblastos, constituindo-se numa proteína estrutural extracelular
457 do tecido ósseo [62]. Portanto, a OTP é um componente orgânico do tecido ósseo [63]. Dentre
458 suas ações, favorece a remodelação óssea e fixação de osteoclastos na matriz mineralizada. A
459 IBS, também denominada sialoproteína 2 ou sialoproteína de ligação celular, é uma proteína de
460 ligação de integrinas que constitui-se num componente extracelular ósseo [64]. Exerce ações
461 locais de nucleação para a formação de cristais de hidroxiapatita, modulando a orientação e
462 deposição da mesma ao longo das fibras de colágeno dentro da matriz extracelular óssea em
463 formação [65]. Dessa forma, também comporta-se como um marcador específico de
464 diferenciação de osteoblastos [46]. Além disso, atua como fator de ligação celular, contribuindo
465 com a sinalização na resposta de diferenciação tecidual, o que lhe atribui caráter pleiotrópico
466 [66]. A expressão dos genes da OTP e IBS é comumente referida como uma 'assinatura
467 osteogênica, típica de osteoblastos [46, 63].

468 Não obstante, nas condições desse estudo, a expressão dos genes da OTP e IBS foram
469 significativamente maiores nas BMMSCs que nas ADSCs (Fig 3I), indicando que a origem
470 (fator 1) exerceu efeito significativo ($p \leq 0,05$) na intensidade de expressão desses genes. Este
471 resultado sugere que, para a expressão dos genes da OTP e IBS, pode haver um
472 comprometimento da população de MSC com o seu nicho tecidual de origem, tal qual discutido
473 e proposto em publicações anteriores [26, 67]. Nestas, elencou-se a possibilidade das MSCs
474 serem células progenitoras indiferenciadas, com comprometimento intrínseco e específico para
475 o seu nicho tecidual. Como há uma íntima relação embrionária entre o desenvolvimento do osso

476 e da medula óssea, a qual persiste na fase pós-natal, com a manutenção de células
477 osteoprogenitoras mesenquimais no periósteo e endósteo [26], seria esperado, como
478 demonstrado nesta pesquisa, que as BMMSCs apresentassem maior comprometimento
479 osteogênico que as ADSCs, devido a natureza do tecido de coleta.

480 Contudo, sendo a expressão gênica da OTP e IBS consideradas uma “assinatura osteogênica”
481 [46, 63], seria esperado também que houvesse maior expressão desses genes entre as BMMSCs
482 diferenciadas em osteoblastos, produzindo matriz extracelular mineralizada rica em fosfatos
483 estáveis como a hidroxiapatita, por exemplo. Mas esta condição não foi observada neste estudo
484 (Fig 3I). A expressão dos genes da OTP e IBS não foi influenciada ($p \geq 0,05$) pelo fator condição
485 de diferenciação, o que sugere que provavelmente a indução de diferenciação osteogênica *in*
486 *vitro* observada nesse estudo não propiciou uma diferenciação ou transdiferenciação real das
487 BMMSCs em osteoblastos funcionais. Esta possibilidade já havia sido problematizada
488 previamente por um grupo de pesquisadores [68]. Segundo estes autores, há três origens de
489 desenvolvimento ósseo embrionário, a crista neural, o mesoderma paraxial e o mesoderma da
490 placa lateral somática. Um osteoblasto verdadeiro deverá ter a capacidade de originar diferentes
491 tipos de tecidos ósseos, apresentando uma expressão gênica tipicamente osteoblástica
492 representada por elevados níveis de OTP e IBS [46].

493 Dessa forma, os resultados desse estudo permitem-nos a inferência que as BMMSCs
494 possivelmente não sejam células-tronco verdadeiras, já que não foi possível demonstrar, pela
495 metodologia adotada, sua diferenciação osteoblástica, conforme postulado por outros autores
496 [1, 69]. Como possíveis fenótipos de pericitos, as BMMSCs não deveriam ter a capacidade de
497 diferenciação ou transdiferenciação osteoblástica, mas apenas modular a resposta de
498 osteoblastos maduros ou imaturos do tecido alvo para a diferenciação osteogênica [59]. Tal
499 provável capacidade de modulação é sugerida neste estudo pela demonstração das expressões
500 dos genes das sialoproteínas OTP e IBS em BMMSCs indiferenciadas, sua condição natural

501 quando isolada do tecido (Fig 3I). Possuindo as sialoproteínas, como a IBS, função pleiotrópica,
502 exibindo a capacidade de contribuir com a sinalização na resposta de diferenciação tecidual
503 [66], tal expressão gênica pode ser interpretada como uma sinalização modulatória pró-
504 osteogênica. Talvez, esta nova perspectiva do comportamento *in vitro* das MSCs possa
505 contribuir para elucidar porque algumas descrições de tratamentos pré-clínicos em tecido ósseo
506 apresentam resultados exitosos [70,71] e outros não [72,73].

507 O OSTERIX (OTX) é um fator de transcrição, também denominado fator sp7, que atua como
508 efector na maturação óssea [74]. Nesta, interage com o fator nuclear de células T ativadas
509 (NFAT), formando um complexo que potencializa a formação óssea mediada por osteoblastos
510 [46]. Além disso, também atua diretamente como fator de diferenciação osteoblástica. Por este
511 motivo, sua expressão é elevada em células osteoblásticas imaturas [8]. A proteína
512 morfogenética óssea (BMP) 2 é um metabológeno reconhecido como fator de crescimento e/ou
513 citocina, produzida por células osteoprogenitoras, osteoblastos, plaquetas, condrócitos e células
514 endoteliais [75]. As BMPs, de forma geral (BMP2 a BMP7), pertencem à superfamília de
515 proteínas do TGF- β e possuem afinidade com receptores transmembrana de serina-treonina
516 quinase (BMPRs) [76]. A interação das BMPs e seu receptor induz a ativação de proteínas
517 transdutoras de sinais de BMPRs, as quais participam da produção de RNA mensageiro
518 (mRNA) para o desenvolvimento do sistema ósseo pós-natal [77]. Dessa forma, a BMP2
519 também comporta-se como um fator de transcrição, precursor da osteogênese [78].

520 Corroborando a esta premissa, as BMMSCs desse estudo exibiram maior expressão ($p \leq 0,05$)
521 dos genes do OTX e da BMP2 que as ADSCs, reiterando a hipótese do provável
522 comprometimento da população de MSC com o seu nicho tecidual de origem [26, 77]. Sendo
523 considerados como fatores precursores da osteogênese, era esperada identificação da maior
524 expressão de ambos em BMMSCs indiferenciadas, tal qual demonstrado neste estudo (Fig 3II).

525 A BMP2 ainda estimula a expressão de OTX [79], tal qual também foi evidenciado nas
526 BMMSCs indiferenciadas desse estudo.

527 Este resultado sugere que as BMMSCs *in vitro*, sob estímulos indutores de diferenciação, são
528 capazes de expressar genes de fatores de modulação de diferenciação osteoblástica, como o
529 OTX e a BMP2. Tal fato reitera a hipótese da ação imunomodulatória das MSCs, como provável
530 principal atividade biológica dessas células [1]. Contudo, aparentemente a expressão dos genes
531 do OTX e da BMP2 não exerceu efeito autócrino positivo para o estímulo da expressão dos
532 genes da OTP e IBS, caso contrário haveria autoindução de diferenciação osteoblástica, com
533 subsequente aumento da expressão desses genes.

534 Cabe destacar ainda que, pesquisas anteriores já haviam demonstrado que algumas BMPs, como
535 a BMP2, são potentes osteoindutores, capazes de induzir fenótipo osteogênico até em células
536 não esqueléticas, as quais, jamais produziram tecido ósseo sob condições fisiológicas [66]. Tal
537 condição pode ser identificada *in vivo* na manifestação clínica da enfermidade “fibrodissplasia
538 ossificante progressiva humana”, causada por uma mutação no receptor BMPRs, a qual
539 potencializa a ação de BMPs, com conseqüente calcificação patológica espontânea [80].
540 Sugere-se que talvez esta ação osteoindutora da BMP2 tenha contribuído para a reação positiva
541 *in vitro* da coloração da matriz extracelular com *Alizarin Red S*, mas são necessários mais
542 estudos para esclarecer esta hipótese.

543 A capacidade osteoindutora das BMPs contribui para as suspeitas que a indução de
544 diferenciação osteogênica *in vitro* em MSCs não gere osteoblastos verdadeiros [59]. Tal
545 suposição, ao menos em parte, pode ser sustentada pelas evidências da baixa expressão dos
546 genes da OTP e IBS nas BMMSCs diferenciadas desse estudo (Fig 3II). Estes resultados
547 corroboram com os achados de alguns pesquisadores que investigaram a origem e
548 comportamento das células formadoras de osteoblastos [59]. Nesta, suscitou-se que ao final do
549 desenvolvimento ósseo pré-natal, forma-se um novo sistema de células osteoprogenitoras,

550 diferente das osteoprogenitoras embrionárias e mais primitivas. Este novo sistema, que se
551 expandirá na fase pós-natal, representa uma linhagem provavelmente responsável pela
552 manutenção da continuidade física e funcional do osso e da cavidade medular [59, 60].
553 Acredita-se que as BMMSCs componham este sistema. Dessa forma, as BMMSCs, *in vivo*,
554 deveriam contribuir com a manutenção de osteoblastos e adipócitos medulares, atendendo
555 melhor as necessidades do esqueleto adulto [68]. Estas pesquisas ressaltam ainda que
556 aumentaram as evidências da íntima relação morfofuncional das BMMSCs com células
557 endoteliais/pericitos, para a manutenção da cavidade medular. Tal observação ressalta a
558 relevância do nicho local e da relação com pericitos para compreender o provável
559 comportamento *in vivo* das BMMSCs e seu reflexo *in vitro*.

560 Desta forma, parece-nos fortemente sugestivo que as BMMSCs desse estudo manifestaram um
561 comportamento *in vitro* pró-osteogênico, como elevação da expressão dos genes do OTX,
562 BMP2, OTP e IBS, demonstrando provável potencial regulador *in vitro* da atividade
563 osteoblástica, sem, contudo, diferenciar-se especificamente em osteoblastos. Tal fato favorece
564 o questionamento crítico da real efetividade de algumas terapias pré-clínicas em tecido ósseo,
565 utilizando ADSCs [38].

566 Com relação a diferenciação condrogênica, tanto BMMSCs quanto ADSCs exibiram reação
567 positiva à coloração de *Alcian Blue*, representando a coloração da matriz extracelular composta
568 por proteoglicanos (Fig 4a,b). Contudo, não foi identificado a formação de *pellets* celulares de
569 condrócitos circinados em lacunas de matriz extracelular. Este resultado sugere que a indução
570 de diferenciação *in vitro* não promoveu diferenciação ou transdiferenciação de BMMSCs e
571 ADSCs em condrócitos. Estudos anteriores demonstraram que células em apoptose ou em
572 necrose podem exibir metacromasia com *Alcian Blue* ou azul de toluidina [59]. Outros corantes
573 indicados para a diferenciação condrogênica, como a Safranina O, por exemplo, apresentam

574 reação cruzada positiva para a presença de DNA, comprometendo a interpretação da reação de
575 coloração da matriz extracelular [59].

576 A avaliação da expressão de dois dos principais genes considerados marcadores de
577 diferenciação condrogênica evidenciou maior expressão do gene do colágeno tipo II (COL II)
578 e do gene da proteína central de proteoglicano (ACCAN) ($p \leq 0,05$) nas BMMSCs que nas
579 ADSCs (Fig 4). O COL II é uma proteína extracelular produzida por células condroprogenitoras
580 e condrócitos maduros, sendo um dos componentes fundamentais da cartilagem hialina e
581 cartilagem elástica [19]. É um marcador específico da condrogênese, sendo sua maior expressão
582 nos condrócitos que nas células condroprogenitoras [81]. Por outro lado, a ACCAN, também
583 conhecida como 'proteína do núcleo proteoglicano específico da cartilagem' ou 'sulfato de
584 condroitina proteoglicano 1' é uma proteoglicana agregante produzida por condrócitos, sendo
585 o principal integrante da matriz extracelular do tecido cartilaginoso [82]. A maior expressão de
586 COL II nas BMMSCs que ADSCs desse estudo sugere o provável comprometimento da
587 população de MSCs com o seu nicho tecidual de origem, já que a condrogênese possui íntima
588 relação com a osteogênese [46]. Esta relação está representada na origem embrionária
589 compartilhada entre condroblastos e osteoblastos, a crista neural, o mesoderma paraxial e
590 mesoderma lateral [83]. Por conseguinte, tal observação permite-nos uma ilação relevante para ser
591 investigada. Como existem três sítios embrionários distintos para a formação tanto de
592 cartilagem, quanto de osso, tal ausência de uma origem embrionária única para as diferentes
593 linhagens condrogênicas e osteogênicas, torna improvável a existência de uma MSC comum a
594 todos os tecidos conjuntivos. Tal conjectura excede os objetivos de investigação do presente
595 estudo, mas como amplia as possibilidades de estabelecimento futuro de novas linhas de
596 pesquisa, tal hipótese não poderia ser negligenciada durante a análise dos dados desta pesquisa.
597 Contudo, identificou-se maior expressão do gene do COL II em BMMSCs indiferenciadas.
598 Pesquisas anteriores já haviam estabelecido maior expressão desse gene em células

599 condroprogenitoras [81,84]. Dessa forma, há evidência consistente que as BMMSCs
600 apresentaram maior comportamento *in vitro* pró-condrogênico que as ADSCs. Dada a relação
601 morfofuncional estrita entre a condrogênese e a cavidade medular e osso, tal resultado é
602 compreensível.

603 Como condrócitos comumente exibem elevada expressão do gene do COL II, provavelmente,
604 nas condições desse estudo, a baixa expressão do gene do COL II em BMMSCs diferenciadas,
605 sugere que não houve diferenciação ou transdiferenciação verdadeira *in vitro*. Esta observação é
606 corroborada pela ausência de identificação de condrócitos circinados em lacunas de matriz
607 extracelular à avaliação microscópica após a realização do ensaio de plasticidade *in vitro* nesse
608 estudo (Fig 4a,b).

609 Contrariamente, as BMMSCs diferenciadas desse estudo apresentaram expressão
610 significativamente maior ($p \leq 0,05$) do gene da ACCAN que as BMMSCs indiferenciadas. Como
611 o gene do ACCAN é comumente expresso por condrócitos maduros [82], este resultado poderia
612 sugerir uma possível diferenciação *in vitro* em condrócitos. Contudo, não foi identificado
613 fenótipo condrogênico típico no ensaio de plasticidade *in vitro* (Fig 4a,b). Como este não é um
614 método fidedigno para demonstração, ou não, de diferenciação de MSCs e o ensaio de
615 expressão gênica demonstrou que apenas o gene da ACCAN foi expresso em BMMSCs
616 diferenciadas, não é possível afirmar, com segurança, se houve diferenciação verdadeira *in vitro*
617 em condrócitos nas BMMSCs desse estudo. Analisados isoladamente, parece-nos que as
618 expressões dos genes do COL II e da ACCAN comportaram-se de maneira extemporânea,
619 quando comparados ao padrão da expressão dos genes relacionados à osteogênese investigados
620 nesse estudo. Por isso, a expressão gênica relacionada a condrogênese nas BMMSCs e ADSCs
621 será reavaliada futuramente, em continuidade ao presente estudo, de forma ampliada, com a
622 análise de transcriptoma e dos fatores precursores da condrogênese.

623

624 Com relação aos fatores precursores da condrogênese, os resultados desse estudo demonstraram
625 ainda que, embora a expressão do gene da BMP2 tenha sido maior nas BMMSCs
626 indiferenciadas, a expressão do gene do COL II não aumentou nas BMMSCs diferenciadas (Fig
627 4). Este resultado sugere que não houve influência da expressão *in vitro* do gene da BMP2 sobre
628 a expressão do gene do COL II. Esta é uma observação relevante, pois o fator de crescimento
629 BMP2 é comumente referido na literatura como um indutor condrogênico [76]. Esta condição
630 não foi observada nesse estudo e sugere-se que, talvez, este fator não represente o principal
631 estímulo condrogênico, conforme foi proposto na literatura especializada [85]. Segundo estes
632 autores, o fator de transcrição SOX 9 parece ser o principal indutor condrogênico *in vivo*. Este
633 fator é produzido por células de origem mesenquimal, como células endoteliais e células
634 precursoras embrionárias da condrogênese, estando intimamente relacionado com a
635 diferenciação de células precursoras de condrócitos. Como não foi objetivo do presente estudo
636 caracterizar molecularmente a condrogênese *in vitro*, a expressão de SOX 9 não foi aferida.
637 Provavelmente, as condições de indução de diferenciação *in vitro* neste estudo, não favoreceram
638 a expressão de SOX 9 pelas BMMSCs isoladas ou as mesmas talvez não possuam a capacidade
639 intrínseca de auto regulação para diferenciação em condrócitos. Contudo, a possibilidade dessas
640 hipóteses precisa ser investigada em novos estudos.

641 Por fim, com relação a diferenciação adipogênica, ADSCs e BMMSCs exibiram reação positiva
642 à coloração com *Oil Red*, apresentando vacúolos lipídicos intracitoplasmáticos evidentes em
643 ambas linhagens (Fig 5a,b). Este resultado corrobora com estudos contemporâneos utilizando
644 ADSCs [86] e BMMSCs [87]. Contudo, em um estudo, foram demonstradas evidências que
645 algumas condições de cultivo podem induzir fenótipo adipogênico transitório, contestando se
646 haveria diferenciação real em adipócitos ou não [88]. Estes pesquisadores demonstraram que o
647 nível elevado de ácidos graxos de algumas apresentações de soro fetal utilizado, como o
648 leporino, por exemplo, pode induzir acúmulo de lipídeos no citosol de linhagens de MSCs, os

649 quais serão corados pelo *Oil Red*, sem que haja uma diferenciação em adipócitos verdadeiros.
650 Suscitou-se que este fenômeno seja mediado por 'receptores proliferadores de peroxissomas'
651 (PPARs), presentes nas membranas de diferentes linhagens mesenquimais. Os PPARs podem
652 ser ativados por ácidos graxos livres e induzem a proliferação de peroxissomas [89]. Este efeito
653 foi demonstrado inclusive em fibroblastos maduros [88], os quais, sob condições fisiológicas,
654 jamais produziram ou acumulariam lipídeos.

655 Para mitigar tais dúvidas, aferiu-se a expressão gênica de dois marcadores comumente descritos
656 para a diferenciação adipogênica de MSCs. A ADIPOQ, conhecida como adiponectina, é um
657 hormônio proteico secretado exclusivamente pelos adipócitos maduros, considerado um dos
658 principais marcadores adipogênicos [19]. A LPL ou lipoproteína lipase, é uma enzima
659 hidrossolúvel expressa por células endoteliais, musculares e do tecido adiposo, com função de
660 triglicerídeo hidrolase e ligante para captação de lipoproteína mediada por receptor [90]. Logo,
661 é predominantemente expressa em diversas células maduras diferenciadas [91]. Neste estudo,
662 as BMMSCs expressaram níveis significativamente maiores ($p \leq 0,05$) dos genes da ADIPOQ e
663 da LPL que as ADSCs (Fig 5). A maior expressão gênica entre BMMSCs pode ser indicativo
664 de um possível comprometimento da linhagem com o tecido de origem, conforme discutido
665 anteriormente para as diferenciações osteogênica e condrogênica. Como tanto a medula óssea,
666 quanto tecido subcutâneo são formados por tecido adiposo unilocular e possuem origem
667 embrionária no mesênquima derivado do mesoderma, o qual origina células osteoprogenitoras,
668 parece haver uma relação embrionária próxima entre adipogênese e osteogênese [19, 81]. Dessa
669 forma, como há mais células indiferenciadas na camada interna do periósteo e no endósteo [92],
670 associada anatomicamente a gordura medular, do que no tecido adiposo subcutâneo, no qual
671 predominam células maduras, era esperado que as BMMSCs apresentassem maior expressão
672 gênica relacionada a adipogênese, que as ADSCs, tal como foi confirmado neste estudo (Fig 5).
673 Tal hipótese pode ser sustentada, pelo menos em parte, pela descrição prévia, *in vivo*, que a

674 gordura unilocular medular de mamíferos é mais resistente à lipólise que a gordura unilocular
675 subcutânea. Além disso, a gordura medular ocupa aproximadamente 50% da medula óssea
676 adulta e tende a expandir-se no espaço medular, em detrimento da lipodistrofia induzida pelo
677 envelhecimento [92], o que sugere que deve existir um componente celular ativo na medula
678 óssea com relevante potencial pró-adipogênico. Baseado nos resultados de expressão *in vitro*
679 dos genes da ADIPOQ e da LPL desse estudo, conjectura-se que provavelmente as BMMSCs
680 contribuam para a manutenção da adipogênese medular pós-natal *in vivo*.

681 Contudo, não foi identificado aumento da expressão dos genes da ADIPOQ e da LPL em
682 BMMSCs diferenciadas (Fig 5). Seria esperado que, se as BMMSCs se diferenciassem em
683 adipócitos, deveria haver maior expressão dos genes da ADIPOQ e da LPL após a indução de
684 diferenciação. Contudo, esta condição não foi observada. A maior expressão desses genes em
685 BMMSCs indiferenciadas pode ser considerado indicativo do potencial pró-adipogênico dessas
686 células, sem, contudo, diferenciação real em adipócitos. É relevante destacar ainda que o gene
687 da LPL, *in vivo*, também é expresso por células endoteliais. Nestas, está unida à superfície
688 luminal de capilares ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPIHBP1) [93]. A hipótese que
689 ADSCs e BMMSCs sejam derivadas de pericitos [9,94], poderia contribuir para explicar porque
690 estas células indiferenciadas expressaram marcadores típicos de tecidos adultos.

691 Em suma, BMMSCs e ADSCs apresentaram, em maior ou menor intensidade, potencial pró
692 osteogênico, condrogênico e adipogênico. Tais potenciais, na maior parte dos casos, estiveram
693 vinculados ao tecido de origem de coleta. A comparação entre as observações de indução de
694 diferenciação *in vitro* com a expressão gênica de marcadores de diferenciação osteogênico e
695 adipogênico, respectivamente, permitiu a constatação que, nas condições desse estudo, não
696 houve diferenciação verdadeira para as linhagens osteogênica e adipogênica. Contudo, a
697 expressão gênica relacionada a condrogênese foi considerada inconclusiva, não sendo possível
698 afirmar, com segurança, se houve ou não diferenciação verdadeira.

699 CONCLUSÃO

700 O tecido de origem de coleta exerceu efeito sobre a expressão da maior parte dos marcadores
701 de diferenciação mesenquimal. As BMMSCs indiferenciadas apresentaram maior expressão *in*
702 *vitro* dos genes associados às linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, mas não se
703 evidenciou expressão gênica típica de osteoblastos e adipócitos em BMMSCs diferenciadas. A
704 expressão gênica relacionada a condrogênese foi considerada inconclusiva, não sendo possível
705 afirmar, com segurança, se houve ou não diferenciação verdadeira. A expressão tanto de
706 marcadores considerados fatores de transcrição ou de crescimento indutores de diferenciação,
707 denotam o provável potencial modulador *in vitro* de BMMSCs e ADSCs para as diferenciações
708 mesenquimais estudadas.

709

REFERÊNCIAS

710

- 711 1. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.*
712 junho de 2017;6(6):1445–51.
- 713 2. Caplan AI. What’s in a name? *Tissue Eng Part A.* agosto de 2010;16(8):2415–7.
- 714 3. De Luca M, Aiuti A, Cossu G, Parmar M, Pellegrini G, Robey PG. Advances in stem cell
715 research and therapeutic development. *Nat Cell Biol.* julho de 2019;21(7):801–11.
- 716 4. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in
717 monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*
718 outubro de 1970;3(4):393–403.
- 719 5. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* setembro de
720 1991;9(5):641–50.
- 721 6. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation:
722 Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci.* setembro de
723 2020;41(9):653–64.
- 724 7. Baek J, Ryu B, Kim J, Lee SG, Oh MS, Hong KS, et al. Immunomodulation of
725 Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rotator Cuff Tears Model.
726 *Biomedicines.* 29 de junho de 2022;10(7):1549.
- 727 8. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell.* 8 de julho de
728 2011;9(1):11–5.
- 729 9. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of
730 mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* setembro de 2008;26(9):2287–99.
- 731 10. Zago MA, Covas DT. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. 2006 [citado 31 de
732 maio de 2023]; Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001591567>
- 733 11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al.
734 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International
735 Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
- 736 12. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and
737 characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood:
738 reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and
739 differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow
740 and adipose tissue. *J Cell Biochem.* abril de 2011;112(4):1206–18.
- 741 13. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal
742 stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* julho de 2016;23(7):1128–39.
- 743 14. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front*
744 *Immunol.* 4 de setembro de 2013;4:201.

- 745 15. Moretta L, Uccelli A, Pistoia V. Mesenchymal stromal cells and immunity: Introductory
746 overview. *Immunol Lett.* dezembro de 2015;168(2):127–8.
- 747 16. Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, et al.
748 Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell*
749 *Stem Cell.* 2 de março de 2017;20(3):345-359.e5.
- 750 17. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* janeiro de
751 2009;217(2):318–24.
- 752 18. Alves EGL, Serakides R, Boeloni JN, Rosado IR, Ocarino NM, Oliveira HP, et al. Estudo
753 comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula
754 óssea e do tecido adiposo de cães adultos. *Pesqui Veterinária Bras.* junho de
755 2016;36(suppl 1):21–32.
- 756 19. Zołocińska A. The expression of marker genes during the differentiation of mesenchymal
757 stromal cells. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ.* maio de
758 2018;27(5):717–23.
- 759 20. Schultz MB, Sinclair DA. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of
760 stem cell aging. *Dev Camb Engl.* 1º de janeiro de 2016;143(1):3–14.
- 761 21. Neto NMA, Feitosa MLT, Sousa SS, Fernandes PB, Pessoa GT, Bezerra D de O, et al.
762 Isolation, Expansion, Differentiation and Growth Kinetics Essay in Mesenchymal Stem
763 Cells Culture from the Bone Marrow of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Sci Vet.*
764 1º de janeiro de 2016;44:11–11.
- 765 22. Costa CRM, Feitosa MLT, Rocha AR, Bezerra DO, Leite YKC, Argolo Neto NM, et al.
766 Adipose stem cells in reparative goat mastitis mammary gland. *PloS One.*
767 2019;14(10):e0223751.
- 768 23. Leite YK de C, Oliveira AC de J, Quelemes PV, Neto NMA, Carvalho CES de, Soares
769 Rodrigues HW, et al. Novel Scaffold Based on Chitosan Hydrogels/Phthalated Cashew
770 Gum for Supporting Human Dental Pulp Stem Cells. *Pharmaceuticals.* fevereiro de
771 2023;16(2):266.
- 772 24. Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-
773 conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and
774 keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 15 de abril de 2010;316(7):1271–81.
- 775 25. Rocha AR, Leite YKC, Silva AS, Conde AM, Costa CRM, Silva GC, et al.
776 Immunophenotyping, plasticity tests and nanotagging of stem cells derived from adipose
777 tissue of wild rodent agouti (*Dasyprocta prymnolopha*). *Arq Bras Med Veterinária E*
778 *Zootec.* 28 de outubro de 2019;71:1571–81.
- 779 26. Fideles SOM, Ortiz AC, Assis AF, Duarte MJ, Oliveira FS, Passos GA, et al. Effect of cell
780 source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem
781 cells derived from bone marrow or adipose tissue. *J Cell Biochem.* julho de
782 2019;120(7):11842–52.

- 783 27. Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, et al. A protocol for isolation and
784 culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc.* março de
785 2010;5(3):550–60.
- 786 28. Liu X, Quan N. Immune Cell Isolation from Mouse Femur Bone Marrow. *Bio-Protoc.* 20
787 de outubro de 2015;5(20):e1631.
- 788 29. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al.
789 Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched
790 comparison. *Stem Cell Res Ther.* 19 de junho de 2018;9(1):168.
- 791 30. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human
792 mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and
793 adipose tissue. *Int J Mol Med.* janeiro de 2016;37(1):115–25.
- 794 31. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O’Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb*
795 *Blood Flow Metab.* fevereiro de 2016;36(2):451–5.
- 796 32. Cathery W, Faulkner A, Maselli D, Madeddu P. Concise Review: The Regenerative
797 Journey of Pericytes Toward Clinical Translation. *Stem Cells Dayt Ohio.* setembro de
798 2018;36(9):1295–310.
- 799 33. Kowalski K, Kołodziejczyk A, Sikorska M, Płaczkiewicz J, Cichosz P, Kowalewska M, et
800 al. Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of Sdf-1/Cxcr4 and
801 Sdf-1/Cxcr7 axis. *Cell Adhes Migr.* 4 de julho de 2017;11(4):384–98.
- 802 34. Liu L, Luo Q, Sun J, Wang A, Shi Y, Ju Y, et al. Decreased nuclear stiffness via FAK-
803 ERK1/2 signaling is necessary for osteopontin-promoted migration of bone marrow-
804 derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 15 de junho de 2017;355(2):172–81.
- 805 35. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and
806 Tissue Repair. *Cells.* 28 de julho de 2019;8(8):784.
- 807 36. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub
808 modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* julho de 2007;28(7):299–307.
- 809 37. Lin W, Xu L, Zwingenberger S, Gibon E, Goodman SB, Li G. Mesenchymal stem cells
810 homing to improve bone healing. *J Orthop Transl.* abril de 2017;9:19–27.
- 811 38. Ng TT, Mak KHM, Popp C, Ng RK. Murine Mesenchymal Stromal Cells Retain Biased
812 Differentiation Plasticity Towards Their Tissue of Origin. *Cells.* 19 de março de
813 2020;9(3):756.
- 814 39. Carvalho MAM de, Argôlo-Neto NM, Silva ERD de FS, Leite YK de C, Pessoa GT,
815 Bezerra D de O, et al. Structural plasticity and isolation of umbilical cord progenitor cells
816 of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) raised in captivity. *Semina Ciênc Agrár.*
817 2019;40(1):225–38.
- 818 40. Kumar K, Agarwal P, Das K, Mili B, Madhusoodan AP, Kumar A, et al. Isolation and
819 characterization of mesenchymal stem cells from caprine umbilical cord tissue matrix.
820 *Tissue Cell.* dezembro de 2016;48(6):653–8.

- 821 41. Utumi PH, Fracaro L, Senegaglia AC, Fragoso FYI, Miyasaki DM, Rebelatto CLK, et al.
822 Canine dental pulp and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as alternative
823 sources for cell therapy in dogs. *Res Vet Sci.* novembro de 2021;140:117–24.
- 824 42. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and
825 characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.*
826 janeiro de 2018;93(1):19–31.
- 827 43. Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. Comprehensive characterization of four different
828 populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties,
829 proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* setembro de 2014;34(3):695–704.
- 830 44. L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A
831 new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine*
832 *Growth Factor Rev.* abril de 2019;46:1–9.
- 833 45. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular
834 Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived
835 Secretome. *Cells.* 16 de maio de 2019;8(5):467.
- 836 46. Zainal Ariffin SH, Lim KW, Megat Abdul Wahab R, Zainal Ariffin Z, Rus Din RD,
837 Shahidan MA, et al. Gene expression profiles for in vitro human stem cell differentiation
838 into osteoblasts and osteoclasts: a systematic review. *PeerJ.* 2022;10:e14174.
- 839 47. Saalbach A, Anderegg U. Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells.
840 *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* junho de 2019;33(6):6689–96.
- 841 48. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, et al. A reduction
842 in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal
843 cells. *Stem Cell Res Ther.* 28 de julho de 2016;7(1):97.
- 844 49. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent
845 hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell.* 13 de dezembro de
846 2007;1(6):635–45.
- 847 50. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, et al. Aryl
848 hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem
849 cells. *Science.* 10 de setembro de 2010;329(5997):1345–8.
- 850 51. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and
851 potential applications. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* junho de
852 2003;17(9):984–92.
- 853 52. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation
854 marker. *Immunol Today.* março de 1993;14(3):121–5.
- 855 53. Courtney AH, Shvets AA, Lu W, Griffante G, Mollenauer M, Horkova V, et al. CD45
856 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Sci Signal.* 22 de outubro de
857 2019;12(604):eaaw8151.

- 858 54. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al.
859 Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta*
860 *Med Iran. janeiro de 2018*;56(1):28–33.
- 861 55. Neves GC da S, Argôlo Neto NM, Ferraz MS, Costa CR de M da, Rocha AR da,
862 Rodrigues HWS, et al. Characterization and plasticity of wharton's jelly mesenchymal
863 stem cells of goat. *Biosci J Online. 2021*;e37002–e37002.
- 864 56. Borghesi J, Ferreira Lima M, Mario LC, de Almeida da Anunciação AR, Silveira Rabelo
865 AC, Giancoli Kato Cano da Silva M, et al. Canine amniotic membrane mesenchymal
866 stromal/stem cells: Isolation, characterization and differentiation. *Tissue Cell. junho de*
867 *2019*;58:99–106.
- 868 57. Xu J, Lian W, Chen J, Li W, Li L, Huang Z. Chemical-defined medium supporting the
869 expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther. 19 de março de*
870 *2020*;11(1):125.
- 871 58. Kosinski M, Figiel-Dabrowska A, Lech W, Wieprzowski L, Strzalkowski R, Strzemecki
872 D, et al. Bone Defect Repair Using a Bone Substitute Supported by Mesenchymal Stem
873 Cells Derived from the Umbilical Cord. *Stem Cells Int. 2020*;2020:1321283.
- 874 59. Robey P. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic
875 use. *F1000Research. 2017*;6:F1000 Faculty Rev-524.
- 876 60. Robey PG. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but
877 promising). *Tissue Eng Part B Rev. dezembro de 2011*;17(6):423–30.
- 878 61. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts'
879 new clothes? *Haematologica. fevereiro de 2009*;94(2):258–63.
- 880 62. Martín-Márquez BT, Sandoval-García F, Corona-Meraz FI, Martínez-García EA,
881 Sánchez-Hernández PE, Salazar-Páramo M, et al. Osteopontin: A Bone-Derived Protein
882 Involved in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Immunopathology. *Biomolecules. 9*
883 *de março de 2023*;13(3):502.
- 884 63. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, et al. Osteopontin
885 is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and
886 collagen gel contraction. *J Clin Invest. 15 de novembro de 1996*;98(10):2218–27.
- 887 64. Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human bone sialoprotein. Deduced
888 protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem. 5 de fevereiro de*
889 *1990*;265(4):2347–51.
- 890 65. Hunter GK, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role
891 of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.
892 *Biochem J. 15 de agosto de 1994*;302 (Pt 1)(Pt 1):175–9.
- 893 66. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast
894 differentiation. *Oral Dis. maio de 2002*;8(3):147–59.

- 895 67. Nguyen VT, Tessaro I, Marmotti A, Sirtori C, Peretti GM, Mangiavini L. Does the
896 Harvesting Site Influence the Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells? *Stem*
897 *Cells Int.* 2019;2019:9178436.
- 898 68. Donsante S, Palmisano B, Serafini M, Robey PG, Corsi A, Riminucci M. From Stem
899 Cells to Bone-Forming Cells. *Int J Mol Sci.* 13 de abril de 2021;22(8):3989.
- 900 69. Atala A. An Interview with Cell Therapy Pioneer, Arnold Caplan. *Stem Cells Transl Med.*
901 6 de junho de 2022;11(6):567–71.
- 902 70. Iijima H, Isho T, Kuroki H, Takahashi M, Aoyama T. Effectiveness of mesenchymal stem
903 cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the
904 establishment of effective regenerative rehabilitation. *NPJ Regen Med.* 2018;3:15.
- 905 71. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem
906 cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a
907 review. *BMC Musculoskelet Disord.* 26 de maio de 2016;17:230.
- 908 72. Winkler S, Niedermair T, Füchtmeier B, Grifka J, Grässel S, Anders S, et al. The impact
909 of hypoxia on mesenchymal progenitor cells of human skeletal tissue in the pathogenesis
910 of heterotopic ossification. *Int Orthop.* dezembro de 2015;39(12):2495–501.
- 911 73. Lukomska B, Stanaszek L, Zuba-Surma E, Legosz P, Sarzynska S, Drela K. Challenges
912 and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int.*
913 2019;2019:9628536.
- 914 74. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel
915 zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation
916 and bone formation. *Cell.* 11 de janeiro de 2002;108(1):17–29.
- 917 75. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors Chur Switz.*
918 dezembro de 2004;22(4):233–41.
- 919 76. Sanchez-Duffhues G, Williams E, Goumans MJ, Heldin CH, Ten Dijke P. Bone
920 morphogenetic protein receptors: Structure, function and targeting by selective small
921 molecule kinase inhibitors. *Bone.* setembro de 2020;138:115472.
- 922 77. Xu L, Liu Y, Sun Y, Wang B, Xiong Y, Lin W, et al. Tissue source determines the
923 differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human
924 mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 6 de
925 dezembro de 2017;8(1):275.
- 926 78. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal
927 stem cells. *Differ Res Biol Divers.* 2016;92(1–2):41–51.
- 928 79. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates
929 Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 24 de
930 outubro de 2008;283(43):29119–25.
- 931 80. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, et al. A recurrent
932 mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia
933 ossificans progressiva. *Nat Genet.* maio de 2006;38(5):525–7.

- 934 81. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization
935 during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and
936 cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med.* 2005;9(4):929–39.
- 937 82. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced
938 primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan.
939 Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 15 de
940 janeiro de 1991;266(2):894–902.
- 941 83. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Dev Camb Engl.* 15 de março de
942 2015;142(6):1023–7.
- 943 84. Mazor M, Lespessailles E, Best TM, Ali M, Toumi H. Gene Expression and
944 Chondrogenic Potential of Cartilage Cells: Osteoarthritis Grade Differences. *Int J Mol*
945 *Sci.* 13 de setembro de 2022;23(18):10610.
- 946 85. Liu CF, Samsa WE, Zhou G, Lefebvre V. Transcriptional control of chondrocyte
947 specification and differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* fevereiro de 2017;62:34–49.
- 948 86. Busser H, Najjar M, Raicevic G, Pieters K, Velez Pombo R, Philippart P, et al. Isolation
949 and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison
950 of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 15 de setembro de
951 2015;24(18):2142–57.
- 952 87. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rad A, Assadzadeh-Aghdaei H, Sharifian
953 A, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from
954 human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2017;10(3):208–13.
- 955 88. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR
956 gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 30 de dezembro de 1994;79(7):1147–
957 56.
- 958 89. Yuan Z, Li Q, Luo S, Liu Z, Luo D, Zhang B, et al. PPAR γ and Wnt Signaling in
959 Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell*
960 *Res Ther.* 2016;11(3):216–25.
- 961 90. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol*
962 *Metab.* agosto de 2009;297(2):E271–288.
- 963 91. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Gene expression and
964 protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells.
965 *BMC Cell Biol.* 20 de dezembro de 2014;15:46.
- 966 92. Patel VS, Chan ME, Rubin J, Rubin CT. MARROW ADIPOSITY AND
967 HEMATOPOIESIS IN AGING AND OBESITY: EXERCISE AS AN INTERVENTION.
968 *Curr Osteoporos Rep.* abril de 2018;16(2):105–15.
- 969 93. Young SG, Davies BSJ, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an
970 endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* novembro de
971 2011;52(11):1869–84.

972 94. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin
973 for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 11 de setembro de
974 2008;3(3):301–13.

975

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho analisando a expressão gênica de linhagens de MSCs desenvolvido no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt) da UFPI. Apesar do seu escopo e delineamento experimental modestos, decorrente das limitações humanas, técnicas, financeiras e do tempo hábil para a conclusão de uma dissertação de mestrado, apresenta relevância salutar para a história do NUPCelt em seu décimo aniversário de fundação.

Não apenas pelos desafios metodológicos inerentes a um novo campo de investigação da biologia das MSCs no NUPCelt, mas principalmente porque os resultados obtidos, apesar de iniciais e que, indubitavelmente, necessitarão ser revisados e ampliados, questionaram as crenças e certezas científicas consolidadas ao longo de uma década por pesquisadores e alunos. E sinto-me honrada em fazer parte deste momento.

Tais questionamentos traduziram-se inicialmente em sentimentos de exasperação e perplexidade a medida que os resultados, lentamente, foram analisados. Posteriormente, transformaram-se em motivação e orgulho, por propiciar-nos o doce sabor da experiência de constatação de uma melhor compreensão científica sobre um fenômeno. Se os nossos dados estiverem corretos e puderem ser comprovados tanto pela reprodutibilidade dos pares, quanto pela ampliação das variáveis e condições de análise, seremos obrigados a rever a produção bibliográfica do NUPCelt acerca do tema. Mas compreendo que esta é justamente a característica mais apaixonante da produção científica.

Parafraseando um dos maiores epistemologistas do século XX, Karl Raimund Popper (Viena, 1902 – Reino Unido, 1994), as teorias devem ser avaliadas por sua capacidade de gerar novos problemas, perspectivas e ampliar seu conteúdo e não, em validar nossas convicções científicas. Provavelmente as MSCs não sejam células-tronco verdadeiras e talvez a indução de diferenciação *in vitro* observada seja um artefato. Mas isto nos permite incontáveis oportunidades para explorar e depurar esta hipótese.

Por fim, em tempos atuais de descrédibilização da ciência, esta modesta pesquisa reiterou a relevância do genótipo e do determinismo biológico inescapável, independente do fenótipo. O que realmente são as MSCs ainda é uma área de fronteira do conhecimento. Mas elas são exatamente o que sempre foram, independente da nossa aparente incapacidade, até o momento, de compreender a sua essência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHADLAQ, A.; MAO, J.J. Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. **Stem Cells And Development**, v. 13, n. 4, p.436-448, 2004.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 92, n. 1-2, p. 41–51, 2016.
- ALVES, ENDRIGO G.L.; SERAKIDES; R; BOELONI, JN; ROSADO, IR; OCARINO, NM; OLIVEIRA, HP; GÓES, AM; REZENDE, CMF. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36 (Supl. 1), p. 21-32. 2016.
- AMABLE, P. R. et al. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. **BMC Cell Biology**, v. 15, n. 1, dez. 2014.
- AMORIN, B.; VALIM, V. S.; LEMOS, N. E.; JÚNIOR, L. M.; SILVA, A. M. P.; SILVA M. A. L.; SILLA L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v. 32, n.1, p.71-81, 2012.
- ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S. The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 10, p. 1150–1163, 15 maio 2015.
- BAEK, J. et al. Immunomodulation of Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rotator Cuff Tears Model. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1549, 29 jun. 2022.
- BEYER NARDI, N.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 174, p. 249–282, 2006.
- BRACHVOGEL, B. et al. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 11, p. 2657–2668, 1 jun. 2005.
- BRINDLE, P. K.; MONTMINY, M. R. The CREB family of transcription activators. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 2, p. 199–204, 1 abr. 1992.

CAMARILLO, C.; SWERDEL, M.; HART, R. P. Comparison of Microarray and Quantitative Real-Time PCR Methods for Measuring MicroRNA Levels in MSC Cultures. **Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications**, p. 419–429, 2011.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, set. 1991.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 28 abr. 2017.

CAPLAN, A. I. What's in a Name? **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 8, p. 2415–2417, 1 ago. 2010.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**, v. 217, n. 2, p.318-324, 2009.

CAPLAN, A.I.; CORREA, D. The MSC: An Injury Drugstore. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 11–15, jul. 2011.

CAPLAN, A.I; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.98 p.1076–1084 , 2006.

CASADO-DÍAZ, A. et al. Transcriptomic Analyses of Adipocyte Differentiation From Human Mesenchymal Stromal-Cells (MSC). **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 4, p. 771–784, 1 abr. 2017.

CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1128–1139, 12 fev. 2016.

CHENG, S. L. et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 277–286, jan. 1994.

COVAS, D.T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: **Atheneu**, 2006. p.35-48.

CRISAN, M. et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 301–313, set. 2008.

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

DIMARINO, A; CAPLAN, AI; BONFIELD, TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. **Frontiers in Immunology**. v.4, p. 201, 2013.

DOMINICI, M; LE BLANC, K; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F; KRAUSE, D; DEANS, R; KEATING, A; PROCKOP, DJ; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, ago. 2006.

FARSHDOUSTI HAGH, M. et al. Different Methylation Patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Cell Journal**, v. 17, n. 1, p. 71–82, 2015.

FRASER, J. K. et al. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. **Cytotherapy**, v. 9, n. 5, p. 459–467, 2007.

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 Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970.

GRANÉLI, C. et al. The effects of PPAR- γ inhibition on gene expression and the progression of induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Connective Tissue Research**, v. 55, n. 4, p. 262–274, 1 ago. 2014.

GRIGORIADIS, A. E.; HEERSCHE, J. N.; AUBIN, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 6, p. 2139–2151, 1 jun. 1988.

GRONTHOS, S. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal Of Cell Science**, v. 116, n. 9, p.1827-1835, 2003.

HAMID, A. A. et al. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. **Clinics**, v. 67, n. 2, p. 99–106, 1 fev. 2012.

HANIFFA et al. Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. **The journal of immunology**. v. 179, n. 3, p. 1595–1604, 1 ago. 2007.

HARRELL, C. R. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1605, 11 dez. 2019.

HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α . **Journal of Cellular Physiology**, v. 166, n. 3, p. 585–592, mar. 1996.

HUANG, Y.; WU, Q.; TAM, P. K. H. Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 10023, 2 set. 2022.

JONES, E. A. et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 12, p. 3349–3360, 1 dez. 2002.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v. 8, n. 3, p. 147–159, maio 2002.

KOLF, C.M. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, n.1, p.204-213, 2007.

KUBO, H. et al. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. **Genes to Cells**, v. 14, n. 3, p. 407–424, mar. 2009.

LIU, C.F. et al. Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 62, p. 34–49, fev. 2017.

LOJUDICE, F.H. Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco progenitoras mesenquimais. 2008. 173f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas, Bioquímica) - Universidade de São Paulo, SP.

MACHADO, M. R.; GARRIDO, R. G. Dentes como fonte de Células-Tronco: uma alternativa aos dilemas éticos. **Revista de Bioética y Derecho**, v. 1, n. 31, p. 60-80, 2014.

MAZOR, M. et al. Gene Expression and Chondrogenic Potential of Cartilage Cells: Osteoarthritis Grade Differences. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10610, 13 set. 2022.

MCBEATH, R. et al. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 483–495, abr. 2004.

MIN, J.-Y. et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n. 5, p. 1568–1575, nov. 2002.

MORETTA, L.; UCCELLI, A.; PISTOIA, V. Mesenchymal stromal cells and immunity: Introductory overview. **Immunology Letters**. v.168, p. 127-128, 2015.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 11, p. e54–e54, nov. 2013.

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

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–7, 1999.

POGGI, A.; VARESANO, S.; ZOCCHI, M. R. How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 262, 2018.

QI, H. et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 6, p. 3305–3310, 11 mar. 2003.

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal Of Cell Communication And Signaling**, v. 10, n. 2, p.103-120, 2016.

ROBEY, P. G. “Mesenchymal stem cells”: fact or fiction, and implications in their therapeutic use. **F1000Research**, v. 6, p. 524, 20 abr. 2017.

SACCHETTI, B. et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 324–336, out. 2007.

SAMSA, W. E.; ZHOU, X.; ZHOU, G. Signaling pathways regulating cartilage growth plate formation and activity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 62, p. 3–15, fev. 2017.

- SCHULTZ, MB; SINCLAIR, D. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. **Development**. v.143, p.3-14. 2016.
- SEN, B. et al. mTORC2 Regulates Mechanically Induced Cytoskeletal Reorganization and Lineage Selection in Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 1, p. 78–89, 19 dez. 2013.
- SHIH, Y.-R. V. et al. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 4, p. 730–738, 23 mar. 2011.
- SHUM, L. C. et al. Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 2, p. 114–122, 15 jan. 2016.
- SONG, N.; SCHOLTEMEIJER, M.; SHAH, K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 9, p. 653–664, 1 set. 2020.
- SUN, H. J. et al. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 24, n. 11, p. 2059–2071, 1 nov. 2006.
- TAN, L. et al. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment — specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 2, p. 296–309, mar. 2022.
- TANG, Y. L. et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. **Regulatory Peptides**, v. 117, n. 1, p. 3–10, 15 jan. 2004.
- TAVASSOLI, M.; CROSBY, W. H. Transplantation of marrow to extramedullary sites. **Science (New York, N.Y.)**, v. 161, n. 3836, p. 54–56, 5 jul. 1968.
- THOMPSON, W. R. et al. Mechanically activated fyn utilizes mTORC2 to regulate RhoA and adipogenesis in mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 11, p. 2528–2537, 1 nov. 2013.
- TYURIN-KUZMIN, P. A. et al. Metabolic Regulation of Mammalian Stem Cell Differentiation. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 85, n. 3, p. 264–278, 1 mar. 2020.

WANG, W.; RIGUEUR, D.; LYONS, K. M. TGF β signaling in cartilage development and maintenance. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 102, n. 1, p. 37–51, mar. 2014.

WANG, Y. et al. miR-431 inhibits adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting insulin receptor substance 2. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, 30 ago. 2018.

YODER, Mervin C. Biology of Stem Cells and Stem Cell Transplantation. **Fetal and Neonatal Physiology**. v.2, p.1365-1373, 2004.

ZAINAL ARIFFIN, S. H. et al. Gene expression profiles for in vitro human stem cell differentiation into osteoblasts and osteoclasts: a systematic review. **PeerJ**, v. 10, p. e14174, 2022.

ZHANG, X. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1206–18, 2011.

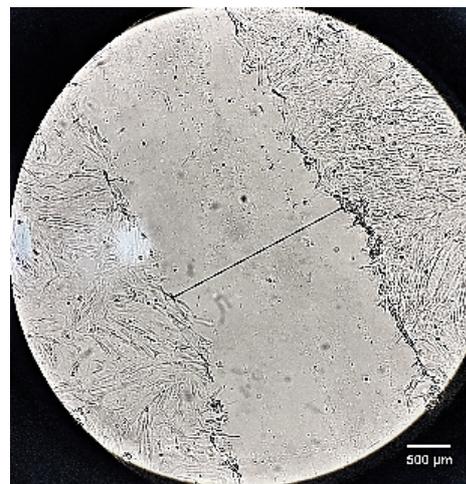
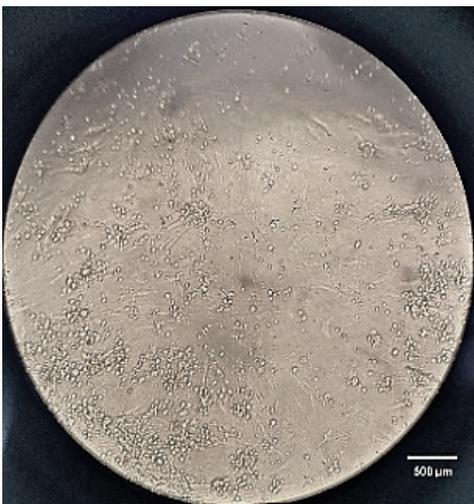
ZOLOCINSKA, A. The expression of marker genes during the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 27, n. 5, p. 717–723, 31 maio 2018.

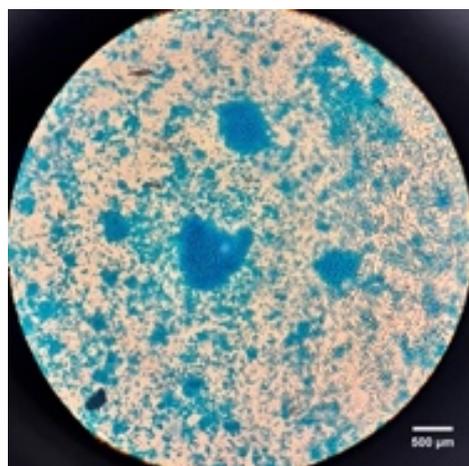
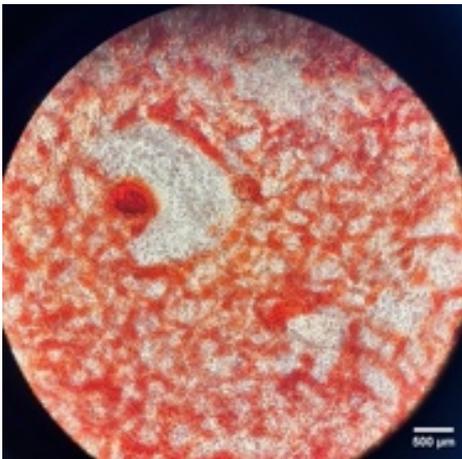
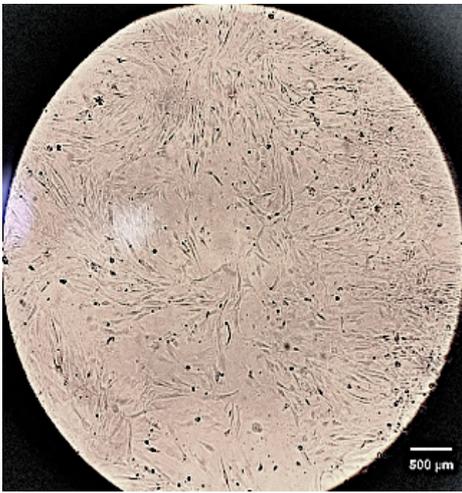
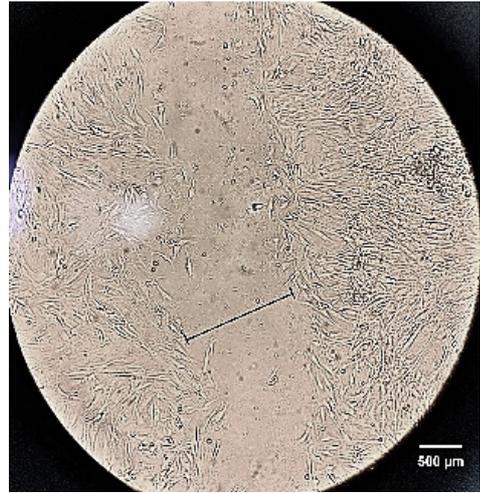
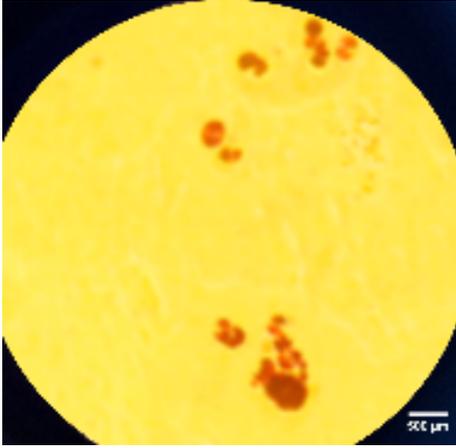
ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, abr. 2001.

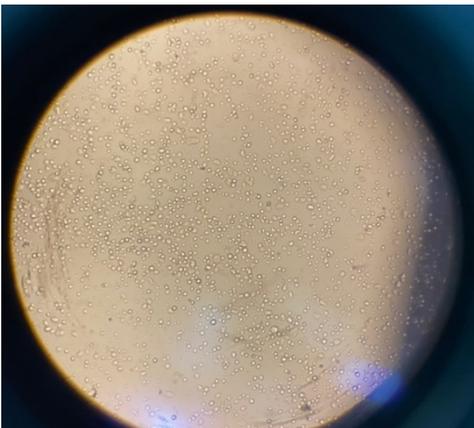
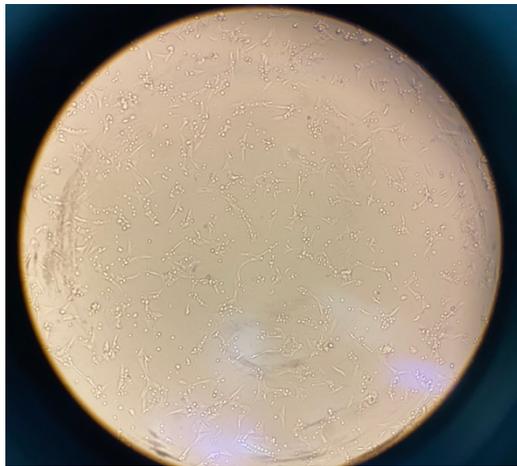
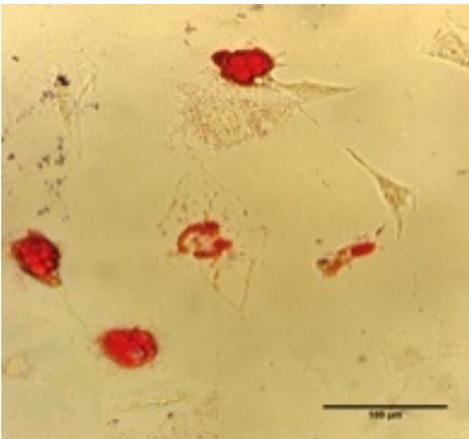
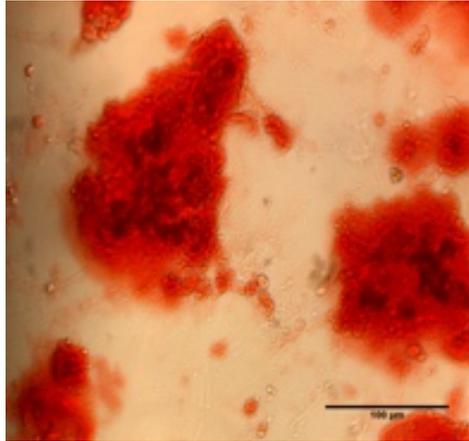
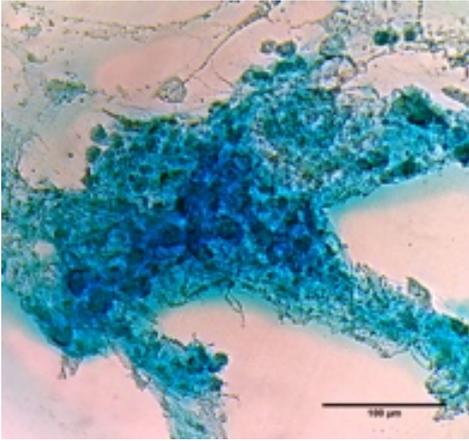
APÊNDICES

Imagens, tabelas e dados estatísticos brutos

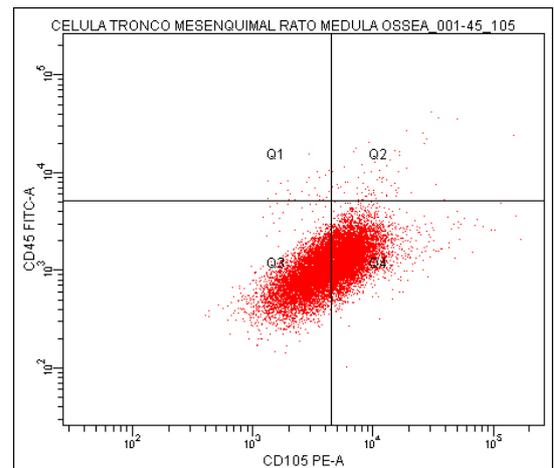
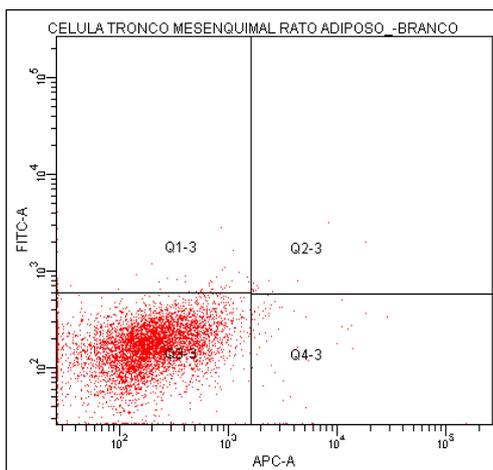
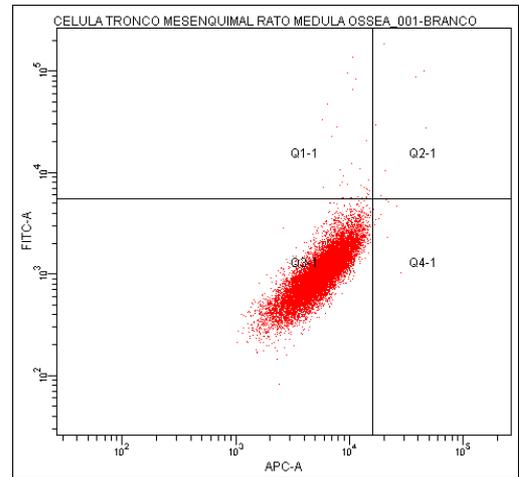
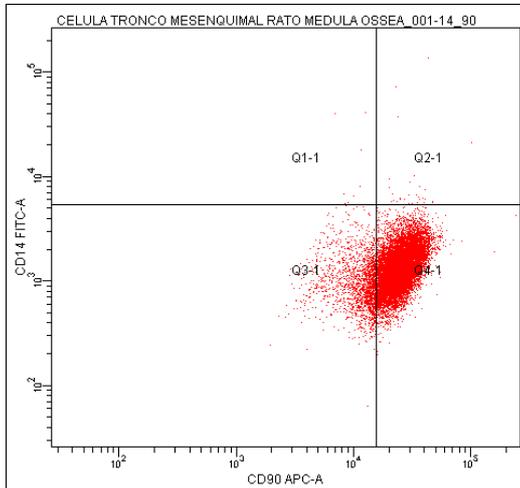
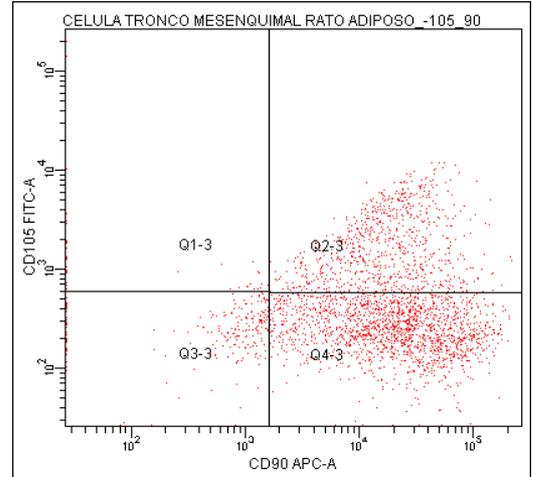
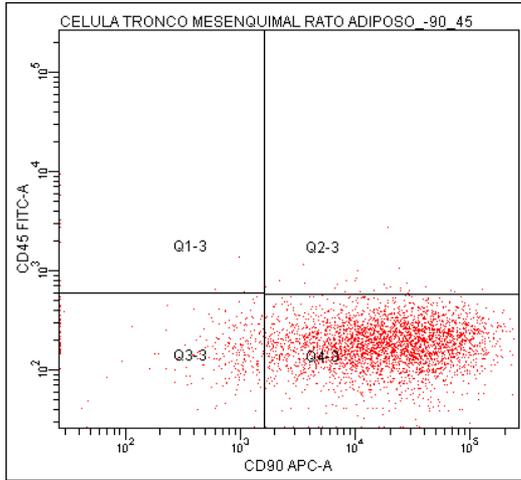
Imagens de cultivo







Imunofenotipagem



Dados estatísticos

		LPL	ADIPOQ	COL II	ACCAN	OTP	BMP2	OTX	IBS
		Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média
Adiposo	I	-0.893 ^d ±0.092	-1.286 ^b ±0.080	-0.206 ^c ±0.342	5.690 ^b ±0.175	7.423 ±0.340	-1.923 ^b ± 0.070	0.140 ^c ±0.158	4.026 ±0.189
	DIF	0.106 ^c ±0.076	0.4733 ^c ±0.090	1.036 ^c ±0.128	5.893 ^b ±0.032	7.7066±0.662	-2.196 ^b ±0.270	1.006 ^c ±0.312	2.946±0.170
Medular	I	2.490 ^a ±0.199	1.136 ^b ±0.543	12.126 ^a ±0.852	5.470 ^p ±0.284	9.090±0.310	0.443 ^a ±0.498	4.506 ^a ±0.240	9.186±1.884
	DIF	1.55 ^b ±0.110	0.176 ^a ±0.466	6.9666 ^b ±1.076	8.936 ^a ±0.973	8.296±0.714	-1.440 ^b ±1.040	3.216 ^b ±1.225	8.453±0.633
Efeitos Principais									
		Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média
Origem	A	-0.393±0.553	-0.406±0.967	0.415±0.719	5.791±0.158	7.565 ^b ±0.495	-2.060±0.231	0.573±0.523	3.486 ^b ±0.613
	M	2.021±0.532	0.656±0.693	9.546±2.956	7.203±2.00	8.693 ^a ±0.656	-0.498±1.263	3.861±1.059	8.820 ^a ±1.319
Condição	I	0.798±1.858	-0.075±1.372	5.960±6.780	5.580±0.243	8.25 ^a ±0.958	-0.740±1.334	2.323±2.398	6.606 ^a ±3.069
	DIF	0.830±0.796	0.325±0.341	4.001± 3.319	7.415±1.77	8.001 ^a ±0.695	-1.818±0.7961	2.111±1.450	5.700 ^a ±3.044
Probabilidade									
Origem		<.0001	0.0010	<.0001	0.0014	0.0067	0.0019	<.0001	<.0001
Condição		0.6818	0.0928	0.0014	0.0003	0.4361	0.0136	0.5874	0.1557
Interação		<.0001	0.0002	<.0001	0.0006	0.1218	0.0467	0.0205	0.7721