



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

FRANCESCA RACCA

**MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE VIAS
OSTEOGÊNICAS EM CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL DE HUMANOS TRATADAS COM
RESVERATROL**

**Piracicaba
2021**

FRANCESCA RACCA

**MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE VIAS
OSTEOGÊNICAS EM CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL DE HUMANOS TRATADAS COM
RESVERATROL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Carleto Andia

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Francesca Racca e orientada pela Profa. Dra. Denise Carleto Andia.

**Piracicaba
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

R114m Racca, Francesca, 1995-
Modulação transcricional de vias osteogênicas em células do ligamento periodontal de humanos tratadas com Resveratrol / Francesca Racca. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Denise Carleto Andia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Transcriptoma. 2. RNA-Seq. 3. Células. 4. Ligamento periodontal. 5. Osteogênese. I. Andia, Denise Carleto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Transcriptional modulation of osteogenic pathways in human periodontal ligament cells treated with Resveratrol

Palavras-chave em inglês:

Transcriptome

RNA-Seq

Cells

Periodontal ligament

Osteogenesis

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Denise Carleto Andia [Orientador]

Renato Corrêa Viana Casarin

Rodrigo Augusto da Silva

Data de defesa: 11-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6249-0760>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8576772090084065>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11 de maio de 2021, considerou a candidata FRANCESCA RACCA aprovada.

PROF^a. DR^a. DENISE CARLETO ANDIA

PROF. DR. RODRIGO AUGUSTO DA SILVA

PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Cristina e a meu pai Claudio. Por todo o apoio, carinho, suporte e por sempre estarem ao meu lado durante todas as minhas conquistas, sendo essenciais para o meu sucesso.

Agradecimentos

À professora Dra. Denise Carleto Andia, pela orientação desde 2015 durante duas iniciações científicas e durante o Mestrado. Por ser uma orientadora presente, paciente, dedicada e exigente. Foram 6 anos de muitos aprendizados, experiências e conquistas que me permitiram crescer como pessoa e profissional, o que não seria possível sem os cuidados e ensinamentos transmitidos por ela.

À Rahyza Inácio Freire de Assis, que presenciou e fez parte da minha trajetória durante os anos de iniciação científica e Mestrado, me ensinando e me orientando sempre com muita paciência. E pela amizade construída a partir da oportunidade de trabalharmos juntas no laboratório.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Francisco Haiter Neto, que foi minha segunda casa durante 8 anos. Que me trouxe experiências e vivências únicas, permitindo, e muitas vezes exigindo meu crescimento e amadurecimento. Sou grata pelos momentos difíceis e pelos inúmeros momentos de felicidade que a FOP me proporcionou.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro que me permitiu contribuir com essa pesquisa.

Ao professor Dr. Rodrigo Augusto da Silva pelas preciosas contribuições e colaborações no nosso projeto.

Aos professores Enilson A. Sallum, Francisco H. Nociti Jr., Karina G. S. Ruiz, Marcio Z. Casati e Renato C. V. Casarin por estarem presentes na minha vida acadêmica durante os períodos de Graduação, Mestrado e Especialização, sempre compartilhando ensinamentos, me apoiando e aconselhando sempre com muita sabedoria e educação. Serei eternamente grata a tudo ao que me foi ensinado por eles.

Aos meus amigos da turma de Mestrado: Camila S. Schmidt, Gabrielle B. Sallum e Hélvis E. Paz, que em pouco tempo se tornaram muito especiais, fazendo com que a rotina na Faculdade se tornasse leve e alegre mesmo em tempos difíceis. Agradeço também a todos os meus amigos de Pós-Graduação especialmente à Elis Lira e Raíssa Garcia pelo carinho e cuidado genuínos e por sempre me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que sempre se disponibilizam a ajudar da melhor maneira possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 134026/2019-5

RESUMO

É fundamental compreender os mecanismos moleculares envolvidos na formação e regeneração óssea para aprimoramento e desenvolvimento de novos tratamentos médicos. Dentro da área de regeneração óssea e tecidual, as células do ligamento periodontal (PDLCs) apresentam grande potencial e têm sido estudadas. Entretanto, a heterogeneidade em seus potenciais osteogênicos tem impacto direto nos resultados clínicos esperados. O Resveratrol, é um composto utilizado como osteoindutor e como tratamento de osteoporose, porém, seus exatos mecanismos osteogênicos nas PDLCs ainda não foram totalmente esclarecidos. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar quais vias de sinalização e genes, relacionados à osteogênese, são modulados pelo Resveratrol em PDLCs de baixo potencial osteogênico (I-PDLCs). As I-PDLCs foram caracterizadas quanto à multipotencialidade (citometria de fluxo), tempo de duplicação celular (PDT) e potencial osteogênico (Alizarin Red - AR). Três experimentos independentes foram realizados com os seguintes grupos: DMEM – PDLCs não induzidas à diferenciação osteogênica, OM - PDLCs induzidas à diferenciação osteogênica por 10 dias e OM/RESV - PDLCs pré-tratadas com Resveratrol 0,1 uM por 3 dias seguido da indução osteogênica por 10 dias. Após 21 dias, realizou-se a coloração com AR. Aos 10 dias, o RNA foi extraído, o sequenciamento realizado e as análises de Bioinformática conduzidas. A população celular foi classificada como I-PDLCs pela comparação com outra população de PDLCs que demonstrou significativamente maior capacidade de deposição de nódulos minerais ($p \leq 0.01$). A fenotipagem celular demonstrou a presença de marcadores de superfície celular CD105 e CD166 e a ausência de CD34 e CD45, indicando a presença de células mesenquimais indiferenciadas. O PDT foi de 29,78h. AR aos 21 dias demonstrou aumento de nódulos minerais *in vitro*, no grupo OM/RESV ($p \leq 0.01$ x OM) pelo teste t de Student. O transcriptoma mostrou que, dentre os genes com $\log_2\text{FoldChange} < -1.5$ ou > 1.5 (genes diferencialmente expressos - DGEs), 915 pertenciam ao grupo OM e 834 ao grupo OM/RESV, com 48 DGEs em comum. Em relação aos genes marcadores osteogênicos, *ALPL*, *BGLAP*, *IBSP* e *SP7* foram mais expressos no grupo OM/RESV ($\log_2\text{FoldChange}$). Análises de enriquecimento gênico mostram o Resveratrol como modulador de diversas vias de sinalização associadas à osteogênese, como a via Hedgehog (Hh) e Notch. Nas análises KEGG, WikiPathways e Hallmarks, a expressão gênica de ligantes da via Hh (*DHH*, *IHH* e *SHH*), receptores de membrana (*PTCH1* e *SMO*) e os fatores de transcrição (FTs) *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* apresentaram-se mais enriquecidos, enquanto o

regulador negativo da via *RAB23*, menos enriquecido no grupo OM/RESV (NOM p value $\leq 0,05$; FDR q value $\leq 0,25$). De acordo com os mesmos parâmetros, a expressão gênica dos receptores da via Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2* e *NOTCH3*), o ligante *JAG1* e o FT *HES1* também foram mais enriquecidos no grupo OM/RESV. O Resveratrol é um modulador de vias de sinalização e genes associados à osteogênese, e sua ação pode estar relacionada ao aumento do potencial osteogênico de PDLcs com baixo potencial osteogênico observado *in vitro*.

Palavras-chave: Transcriptoma. RNA-Seq. Célula. Periodontal. Osteogênese. Vias de Sinalização. Genes.

ABSTRACT

It is essential to understand the molecular mechanisms involved in bone formation and regeneration for improving and developing new medical treatments. Within the area of bone and tissue regeneration, periodontal ligament cells (PDLCs) have great potential and have been studied. However, heterogeneity in its osteogenic potentials has a direct impact on expected clinical results. Resveratrol is a compound used as an osteoinductor and as a treatment for osteoporosis, however, its exact osteogenic mechanisms in PDLCs have not yet been fully clarified. Thus, the aim of the study was to investigate which signaling pathways and genes, related to osteogenesis, are modulated by Resveratrol in PDLCs of low osteogenic potential (I-PDLCs). L-PDLCs were characterized for multipotentiality (flow cytometry), population doubling time (PDT) and osteogenic potential (Alizarin Red - AR). Three independent experiments were carried out with the following groups: DMEM - PDLCs not induced to osteogenic differentiation, OM - PDLCs induced to osteogenic differentiation for 10 days and OM/RESV - PDLCs pre-treated with Resveratrol 0.1 μ M for 3 days followed by osteogenic induction for 10 days. After 21 days, staining with AR was performed. At 10 days, RNA was extracted, sequencing was performed and Bioinformatics analyses conducted. The cell population was classified as I-PDLCs by comparison with the other population of PDLCs that demonstrated significantly higher deposition capacity of mineral nodules ($p \leq 0.01$). Cellular phenotyping demonstrated the presence of CD105 and CD166 cell surface markers and the absence of CD34 and CD45, indicating the presence of undifferentiated mesenchymal cells. The PDT was 29,78 h. AR at 21 days showed an increase in mineral nodules *in vitro* in the OM/RESV group ($p \leq 0.01 \times OM$) by student's t-test. The transcriptome showed that, among the genes with $\log_2\text{FoldChange} < -1.5$ or > 1.5 (differentially expressed genes - DGEs), 915 belonged to the OM group and 834 to the OM/RESV group, with 48 DGEs in common. Related to osteogenic marker genes, ALPL, BGLAP, IBSP and SP7 were more expressed in the OM/RESV group ($\log_2\text{FoldChange}$). Gene enrichment analyses show Resveratrol as a modulator of several signaling pathways associated with osteogenesis, such as hedgehog (Hh) and Notch pathways. In the KEGG, WikiPathways and Hallmarks analyses, the gene expression of Hh pathway ligands (DHH, IHH and SHH), membrane receptors (PTCH1 and SMO) and transcription factors (TFs) GLI1, GLI2 and GLI3 were more enriched, while the negative regulator of the RAB23 pathway, less enriched in the OM/RESV group (NOM p value ≤ 0.05 ; FDR q value ≤ 0.25). According to the same parameters, the gene expression of the Notch pathway receptors (NOTCH1, NOTCH2 and NOTCH3), the JAG1 binder and TF HES1 were also more enriched in the OM/RESV group. Resveratrol is a modulator of signaling pathways and genes associated with osteogenesis, and its action may be related to the increase in the osteogenic potential of PDLCs with low osteogenic potential observed *in vitro*.

Key-words: Transcriptome. RNA-Seq. Cell. Periodontal. Osteogenesis. Signaling pathways. Genes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	78
ANEXO 1 - AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E TRATAMENTOS COM RESVERATROL.....	78
ANEXO 2 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	79
ANEXO 3 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	80

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo composto principalmente de matriz mineral e matriz orgânica (Wang et al., 2012; Walmsley et al., 2016) que possui capacidade intrínseca de regeneração como parte do processo de reparo em resposta a lesões durante o desenvolvimento esquelético e durante a remodelação contínua que ocorre ao longo da vida adulta (Bates & Ramachandran, 2007). A regeneração óssea é composta por uma série bem orquestrada de eventos biológicos de indução e condução óssea, envolvendo diversos tipos celulares e vias de sinalização molecular intracelular e extracelular, com uma sequência temporal e espacial definível, com o objetivo de reparar e restaurar a função esquelética (Cho et al. 2002). Entretanto, apesar de o tecido ósseo apresentar capacidade considerável em se reparar, regenerar e continuar sendo um órgão ativo através da remodelação contínua durante a vida adulta, existem situações adversas nas quais a regeneração é necessária em grandes quantidades, como em reconstruções de grandes defeitos ósseos resultantes de traumas, infecções, ressecções tumorais e anormalidades esqueléticas, ou em casos onde o processo de regeneração está comprometido como por exemplo quando há presença de necrose avascular ou osteoporose (Dimitriou et al., 2011; Majidinia, 2018).

Um desafio constante na Odontologia, é o manejo dos defeitos infra ósseos resultantes do processo patológico da doença periodontal. Os tratamentos para restaurar os tecidos perdidos em decorrência da doença periodontal se dividem em intervenções cirúrgicas e não-cirúrgicas. Dentro das intervenções cirúrgicas, o uso de células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cells, MSCs), associadas ou não a biomateriais, tem sido proposto como uma alternativa promissora em tratamentos regenerativos devido a sua larga distribuição em tecidos adultos e capacidade de diferenciação em diversos tecidos (Takewaki et al., 2017; Tassi et al., 2017). Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* - ISCT) definiu critérios mínimos para a caracterização dessas células, sendo eles: aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultura celular; expressar marcadores de superfície como CD105, CD73 e CD90; não expressarem os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR. Além disso, devem ser capazes de se diferenciar em pelo menos três linhagens celulares - osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Dominici et al., 2006).

Alguns estudos envolvendo essas células demonstraram regeneração de tecidos danificados, mínima morbidade do sítio doador, comparado com enxertos autógenos, e baixo risco de rejeição autoimune e transmissão de doenças (Moshaverinia et al., 2013; Mastrolia et al., 2019). Células indiferenciadas podem ser isoladas a partir de diversos tecidos como a medula óssea (BMSCs), o tecido adiposo (ASCs) (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002) e os tecidos odontogênicos (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2000; Zhang et al., 2009; Seo et al., 2004). Um estudo realizado em 2017 por Ai et al. comparou células derivadas da polpa dental, do ligamento periodontal e do folículo dental e observou que as células derivadas do ligamento periodontal (PDLCs) apresentaram maiores níveis de transcrição de fatores osteogênicos relacionados às vias osteogênicas como CD109, *SMAD3*, *ALP*, *OCN* e *RUNX2*, maior potencial osteogênico *in vitro* e maior capacidade de formação óssea *in vivo* em relação às células derivadas do folículo dental e da polpa. Entretanto, em estudo realizado por Saito et al., em 2014, clones de PDLCs enriquecidos com marcador de superfície CD105, demonstraram que, mesmo quando derivados de uma mesma população celular, podem apresentar heterogeneidade de deposição de matriz mineral *in vitro*, podendo, portanto, apresentar potenciais osteogênicos distintos. Recentemente, nosso grupo de estudo investigou como o RG108, um inibidor de DNMTs, poderia modular epigeneticamente genes marcadores ósseos e de multipotencialidade, aumentando a deposição de matriz mineral em PDLCs com baixo potencial osteogênico (Assis et al., 2021). Nesse sentido, é essencial investigar e identificar as possíveis causas da heterogeneidade apresentada por PDLCs com relação ao potencial osteogênico, pois isto pode se apresentar-se como um fator limitante à aplicabilidade clínica em tratamentos de regeneração tecidual. Além disso, a possibilidade de direcionar o comprometimento celular e utilizar osteoindutores para aumentar o potencial osteogênico em PDLCs com baixo potencial osteogênico, pode ser benéfica, aumentando a previsibilidade de resultados de regeneração.

O Resveratrol, um polifenol natural amplamente encontrado na natureza e comumente presente nas dietas através da uva preta, vinho tinto, amendoins, açaí, e outras espécies de plantas (Raut et al., 2019), demonstrou ter potencial osteoindutor. Associado à prevenção e tratamento da osteoporose, mostrou estimular a proliferação e diferenciação osteogênica de células pré-osteoblásticas, aumentou a densidade mineral óssea, preveniu danos oxidativos e osteoclastogênese, prevenindo a osteoporose em experimentos *in vivo*

(Mobasheri, 2013; Weng, 2017; Feng, 2018; Yang, 2019). Também demonstrou resultados promissores quanto ao aumento da densidade mineral óssea e fosfatase alcalina *in vivo*, afetando positivamente a formação ou mineralização óssea em pacientes obesos (Ornstrup et al., 2014). Em MSCs senescentes, ativou a via MAPK de sinalização aumentando a diferenciação osteogênica (Zhou et al., 2019). Em ratos expostos à inalação da fumaça de cigarro, otimizou o reparo de defeitos ósseos de tamanhos críticos (Franck et al., 2018), além de reverter mudanças transcricionais e epigenéticas causadas pelo cigarro em genes relacionados ao osso e à maquinaria epigenética (Lameira et al., 2018).

A diferenciação osteogênica se dá através da ativação de vias e cascatas de sinalização, compostas por moléculas sinalizadoras que apresentam funções específicas. Durante a osteogênese, diversas vias de sinalização podem estar envolvidas, como por exemplo a via TGF- β /BMPs (Transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein) canônica ou não-canônica, a via Wnt (Wingless-Type) canônica, não-canônica ou de polaridade planar, a via do Cálcio (Ca²⁺), a via FGF (Fibroblast Growth Factor), a via IGF (Insulin-like Growth Factor), a via Hedgehog e a via Notch de sinalização (Chen et al., 2012; Hayrapetyan et al., 2015).

Para que haja um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios dessas vias é necessária uma análise transcricional do genoma. Através do RNA-Seq, método de análise que utiliza o sequenciamento de próxima geração (Next-Generation Sequencing, NGS), é possível investigar sistemática e imparcialmente as informações biológicas celulares em larga escala ou em todo o genoma (Kebschull et al., 2017; Qi et al., 2017).

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar se o Resveratrol pode aumentar o potencial osteogênico em I-PDLCs, investigando quais vias de sinalização e genes relacionados à osteogênese foram modulados. Explorar os mecanismos celulares relacionados à osteogênese e a possibilidade de aumento do potencial osteogênico com osteoindutores poderá beneficiar as abordagens clínicas de regeneração tecidual.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com o fim da Segunda Guerra Mundial, em 1945, foi necessário iniciar um extenso programa de pesquisa em relação aos efeitos da radiação no corpo humano. Um desses efeitos foi a destruição de células na medula óssea, levando pacientes expostos à altas doses de radiação a um grave quadro de anemia. O tratamento proposto apresentava como lógica o transplante de medulas-ósseas não afetadas. O próximo passo, seguindo o mesmo raciocínio, foi o tratamento de neoplasias hematológicas a partir de ablação induzida por radiação, seguida de transplante de medula-óssea de doadores. Apesar dos problemas inesperados em relação à rejeição imunológica, foi a partir desse momento que se iniciaram as pesquisas em relação às células da medula óssea (BMSCs) que até hoje, mais de 50 anos depois, continuam a ser alvo de estudos e ensaios clínicos para o tratamento de diversas condições e doenças (Armstrong et al., 2012).

Os tecidos hematopoiéticos da medula óssea fornecem continuamente células sanguíneas diferenciadas, as quais tem função essencial para a vida; essas células apresentam curto tempo de vida e não apresentam auto renovação; portanto, a reposição dessas células depende da existência de células que não só produzam novas cópias delas mesmas, mas também que deem origem a novas células diferenciadas para manter a função sanguínea. Em 1963, James Till, Ernest McCulloch e Becker demonstraram pela primeira vez as células-tronco hematopoiéticas (HSC), as quais são a base do sistema hematopoiético descrito acima, ao mostrarem que um número limitado de BMSCs podia dar origem a colônias clonais de células eritróides e mieloides nos baços de ratos irradiados.

Células-tronco tem a capacidade de auto renovação e de dar origem a diversos tipos de linhagens celulares. Em termos gerais, existem dois tipos principais de células-tronco, embrionárias e não embrionárias. As células-tronco embrionárias (ESCs) são derivadas da massa interna celular do blastocisto e podem se diferenciar em células das três camadas germinativas. Entretanto, a formação de teratomas e questões éticas dificultam pesquisas e aplicações clínicas com esse tipo celular. Por outro lado, células-tronco não-embrionárias, geralmente células-tronco adultas, são de alguma forma especializadas e apresentam potencial de diferenciação limitado. Essas células podem ser isoladas a partir de diversos tecidos e são atualmente as células mais utilizadas na área de Medicina Regenerativa.

Recentemente, outro tipo de célula-tronco não-embrionária, conhecida como célula-tronco pluripotente induzida (iPSC) emergiu como uma grande descoberta na biologia regenerativa, pois são células geradas através da expressão forçada de fatores de transcrição definidos, os quais resetam o destino das células somáticas para um estado de célula-tronco embrionária (Wang et al., 2012).

Um tipo de célula-tronco não embrionária, a célula-tronco mesenquimal (MSCs), tem gerado grande interesse no campo da medicina regenerativa por suas propriedades biológicas únicas. Em 1968, Friedenstein et al., na tentativa de entender como o transplante de osso descelularizado em sítios ectópicos gerava osso através de células de outros tecidos, identificou células tipo fibroblastos da medula óssea capazes de realizar osteogênese *in vivo*. Até então acreditava-se que essas células eram componentes da medula responsáveis pelo suporte e nutrição das funções hematopoiéticas da medula óssea, mas a habilidade de se diferenciarem em outros tipos celulares, como adipócitos e condrócitos, demonstraram outros potenciais de linhagem. Dessa forma, a multipotencialidade das células fibroblásticas aderentes foi reconhecida e estas passaram a ser conhecidas como MSCs (Armstrong et al., 2012).

Devido à dificuldade na obtenção das BMSCs, incluindo dor, morbidade e baixo número celular na coleta, outras fontes celulares têm sido amplamente buscadas e estudadas. MSCs derivadas do tecido adiposo por lipectomia assistida por sucção (lipoaspiração) (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002) e populações tipo-MSCs a partir do cordão umbilical foram isoladas e caracterizadas (Mareschi et al., 2001). Tecidos odontogênicos também demonstraram ser fonte de obtenção de MSCs, como a polpa dental (Gronthos et al., 2000), dentes decíduos esfoliados (Miura et al., 2000), tecidos gengivais (Zhang Q et al., 2009), papila apical (Sonoyama et al., 2006) e ligamento periodontal (Seo et al., 2004). Essas células têm a capacidade de se diferenciar em linhagens mesenquimais incluindo osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições *in vitro* e *in vivo* (Dan et al., 2006), demonstrando sua importância dentro do campo da regeneração tecidual.

O tecido do ligamento periodontal é principalmente composto de células mesenquimais derivadas do folículo dental, portanto, as células-tronco do ligamento periodontal (PDLcs) são capazes de se diferenciar em diversos tipos de linhagens celulares

mesenquimais (Tomokiyo et al., 2019). Em 2004, Seo et al. conseguiram diferenciar PDLCs de humanos em células tipo osteoblasto, as quais formaram nódulos minerais positivos para o ensaio de Alizarina Red, apresentando a expressão de genes marcadores relacionados à osteogênese. Além disso, eles também demonstraram o potencial de diferenciação das PDLCs em células tipo adipócito, contendo vacúolos lipídicos em seus citoplasmas e expressão de genes marcadores relacionados à adipogênese. Xu et al., em 2009, tiveram sucesso em gerar células tipo condrócitos a partir de PDLCs bem como células tipo osteoblastos e adipócitos. Outro estudo demonstrou que as PDLCs expostas à tensão mecânica a curto prazo podem se diferenciar em monócitos cardíacos expressando marcadores celulares cardíacos, actina sarcomérica e proteínas T da troponina cardíaca (Pelaez et al., 2017). Foi demonstrado também que as PDLCs apresentaram capacidade de diferenciação neurogênica (Techawattanawisal et al., 2007; Kadar et al., 2009; Dapeng et al., 2014; Ng et al., 2015). Portanto, pode-se dizer que o ligamento periodontal contém uma população de células-tronco imaturas que podem se diferenciar não apenas em células de linhagem mesenquimal, mas também em outras linhagens celulares, sendo assim, uma fonte atrativa para a medicina regenerativa.

Na Odontologia, um dos principais desafios é a regeneração de defeitos infra-ósseos resultantes do processo de inflamação decorrente da doença periodontal. Dentre os tratamentos propostos para reverter esse cenário, o uso de MSCs tem sido amplamente estudado e proposto como uma alternativa aos tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos convencionais. Com o objetivo de promover a regeneração do tecido periodontal lesado a partir das PDLCs, diversos estudos *in vivo* foram realizados. Seo et al. transplantaram PDLCs de humanos com um *scaffold* de hidroxiapatita em defeitos periodontais formados artificialmente nos molares mandibulares de camundongos imunodeficientes; após 8 semanas, confirmaram a reconstituição de cemento e estruturas tipo ligamento periodontal nos sítios transplantados, sugerindo a importância das PDLCs na regeneração periodontal.

Em 2014, Ninomiya et al. também transplantaram PDLCs de ratos ou células diferenciadas do ligamento periodontal com discos de hidroxiapatita abaixo da fáscia dos músculos dorsais de ratos tipo Lewis. Após 12 semanas, novo tecido ósseo foi formado ao redor do disco nos ratos com PDLCs.

Diversos estudos tentaram regenerar os tecidos periodontais utilizando PDLC *sheets* com diversos *scaffolds* e fatores de crescimento. Gao et al. criou *cell sheets* utilizando PDLCs de humanos tratadas com ostol, um derivado da cumarina, juntamente com *scaffolds* de hidroxiapatita e Beta fosfato tricálcio (β -TCP) na região dorsal dos camundongos. Após 4 semanas, o grupo teste com as PDLCs formou maior quantidade de tecido mineralizado na superfície dos *scaffolds* do que o grupo controle.

Em 2017, Wang et al. desenvolveram três tipos de *cell sheets* derivadas de PDLCs de humanos, de células mesenquimais do osso mandibular (JBMSCs) e a combinação de ambos. As células eram tratadas com fibrina rica em plaquetas e misturadas com hidroxiapatita/B-TCP e matriz de dentina humana, e em seguida eram transplantadas na região dorsal do camundongo. O grupo das PDLCs *sheets* produziu estruturas fibrosas enquanto o grupo das JBMSCs mostrou-se propenso à formação de tecido mineralizado, enquanto o grupo com os dois tipos celulares exibiu um balanço entre novo ligamento periodontal e tecidos ósseos.

Suaid et al. em 2012 avaliaram o uso de PDLCs no tratamento de defeitos de furca classe III cirurgicamente criados em cachorros. O experimento continha 4 grupos: o grupo controle, no qual realizava-se o retalho reposicionado coronalmente, o grupo de Regeneração Tecidual Guiada (RTG), o grupo tratado com esponja + RTG e o grupo tratado com a esponja + PDLCs + RTG. Os resultados demonstraram que o grupo com associação das PDLCs com RTG promoveu maior regeneração periodontal em defeitos de furca classe III do que os demais grupos.

Baseado nesses resultados, diversos ensaios clínicos foram realizados utilizando PDLCs autólogas. Feng et al. demonstraram transplante de PDLCs autólogas de humanos em defeitos infra-ósseos de bolsas periodontais profundas de três pacientes. Após 6 anos de acompanhamento, a reentrada cirúrgica da área implantada e através de radiografia demonstrou regeneração definitiva do periodonto de dois pacientes. Além disso, aos 3, 6 e 42 meses, os três pacientes demonstraram diminuição significativa de mobilidade, profundidade de sondagem e aumento nos níveis de inserção.

Shalini et al. comparou 28 pacientes com periodontite tratados com debridamento com retalho aberto ou debridamento com retalho aberto seguido de transplante autólogo de PDLCs. O tratamento com as PDLCs demonstrou melhores resultados para redução na

profundidade de sondagem, nível de perda de inserção clínica e aumento na densidade óssea mineral aos 3, 6, 9 e 12 meses no grupo debridamento com retalho aberto seguido com transplante autólogo, em comparação ao grupo que utilizou apenas debridamento com retalho aberto.

Os estudos sugerem que o uso de PDLCs humanas autólogas para o tratamento de defeitos ósseos foi seguro e efetivo, entretanto, mais estudos devem ser realizados para entender qual o melhor protocolo de utilização dessas células uma vez que as PDLCs compreendem uma população de células heterogênea, com capacidade de se comprometer com diversas linhagens e, portanto, podem apresentar potenciais de diferenciação distintos, mesmo tendo a mesma fonte de origem (Lindroos et al., 2008; Saito et al., 2014).

Dentro da medicina regenerativa, não apenas fatores de crescimento e biomateriais são estudados. Moléculas denominadas “pequenas moléculas” osteoindutoras vem sendo estudadas como alternativas mais viáveis por mostrarem redução dos efeitos colaterais e apresentarem bons resultados na reparação tecidual. As “pequenas moléculas” são componentes bioquímicos de origem natural ou sintética que elicitam respostas celulares através da ativação de cascatas de sinalização com a finalidade de induzir a formação óssea e a diferenciação celular de células-tronco (Aravamudhan et al., 2013). Nesse sentido, é interessante pensar nessas moléculas não só como auxiliares da engenharia tecidual, mas também como alternativas para aumentar o potencial osteogênico de MSCs uma vez que essas apresentam população heterogênea.

Dentro desse grupo de moléculas, podemos citar o Resveratrol, também conhecido como 3,4', 5-trihydroxystilbene, que é um polifenol membro da classe dos estilbenos (Baur, 2006). A história desse composto pode ser traçada desde milhares de anos atrás. O primeiro uso conhecido de extratos de uvas para a saúde humana é datado de mais de 2000 anos atrás, a partir de uma preparação indiana de ervas muito conhecida chamada “darakchasava” na qual o ingrediente principal é *Vitis vinífera* L. Esse medicamento é prescrito como cardiotônico e também é utilizado para o tratamento de outras desordens (Paul et al., 1999). O uso de uvas secas como cardiotônico é bem documentado. A análise de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de “darakchasava” revelou polifenóis como o Resveratrol e pterostilbeno. Essa formulação antiga se tornou interessante devido aos conhecimentos adquiridos recentemente em relação ao Resveratrol (Aggarwal et al., 2004).

O Resveratrol foi identificado pela primeira vez em 1940 como um componente das raízes da planta Heléboro Branco - *Veratrum grandiflorum* O. Loes (Takaoka, 1940) e em seguida nas raízes secas de *Polygonum cuspidatum* também chamada de Ko-jo-kon em japonês, utilizada na Medicina Chinesa e Japonesa no tratamento de dermatite supurativa, gonorréia fava, tinea pedis e hiperlipemia (Aggarwal et al., 2004). Em 1976, foi identificado Resveratrol na epiderme da folha e na pele de bagas de uvas, mas não em seu “corpo” (Langcake and Pryce, 1976; Langcake and McCarthy, 1979; Creasy e Coffee, 1988). Sabe-se que esse composto é produzido por ampla variedade de plantas além das uvas, como os amendoins e amoras em resposta ao estresse, injúria, radiação ultravioleta (UV) e infecções fúngicas. Quanto à concentração de Resveratrol, as peles de uvas frescas contêm 50-100 mg de Resveratrol por grama de uva, e nos vinhos varia de 0,2 mg/l a 7,7 mg/l. O achado epidemiológico da relação entre o consumo de vinho tinto e a incidência de doenças cardiovasculares tem sido chamado de “O paradoxo francês” (Kopp, 1998; Sun and Sun, 2002) e devido à inúmeras razões, os efeitos cardioprotetores dos vinhos tintos têm sido atribuídos ao Resveratrol (Hung et al., 2000). Dentre esses efeitos, pode-se incluir a supressão da peroxidação lipídica e a síntese de eicosanoides, a inibição da agregação plaquetária e atividades anti-inflamatórias e vasorrelaxantes (Bhat et al., 2001). Inúmeros relatos indicam que o Resveratrol tem efeitos antivirais contra o HIV-1 (Heredia et al., 2000) e contra o vírus herpes simples (Docherty et al., 1999; Docherty et al., 2004), demonstrando também ter efeitos antibacterianos (Chan, 2002), incluindo a inibição do crescimento de diferentes cepas de *Helicobacter pylori* (Daroch et al., 2001; Mahady et al., 2003; Mahady and Pendland, 2000). Atividades anticancerígenas também são associadas ao Resveratrol, uma vez que este demonstrou propriedades anticancerígenas relacionadas às vias de sinalização afetadas, interações entre proteínas, modulação de fatores de transcrição, indução de genes e regulação de atividades enzimáticas; em estudos *in vitro*, mostrou-se farmacologicamente seguro e passível de uso para o tratamento e prevenção do câncer (Aggarwal et al., 2004). Outro campo que vem sendo muito explorado levando em consideração os efeitos do Resveratrol é o campo do antienvhecimento devido às propriedades antioxidantes desse composto, as quais demonstraram atrasar o processo de envelhecimento (Novelle et al., 2015; Sadowska-Bartosch and Bartosz, 2014).

Além dos efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios, antibacterianos, anticancerígenos e antienvhecimento, o Resveratrol também apresenta relação com a formação óssea, com inibição da atividade de osteoclastos, estimulação da diferenciação de osteoblastos, agindo contra a perda óssea em ratos ovariectomizados (Zhou, 2019). Nesse sentido, muitos estudos relacionados ao tratamento da osteoporose têm focado no Resveratrol como forma de tratamento ou atenuação da doença. Em 2017, Wang et al., confirmaram em experimento *in vivo* que o Resveratrol aumentou significativamente a densidade mineral óssea e inibiu as porcentagens dos picos de carga e rigidez em ratos com osteoporose. Além disso, demonstraram como benefícios adicionais do Resveratrol a inibição dos níveis séricos de fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OCN) em ratos com osteoporose, mediando a via de sinalização SIRT1-NF- κ B. Outro estudo *in vivo* demonstrou que o Resveratrol aumentou a atividade transcricional de FoxO1 inibindo a via de sinalização PI3K/AKT obtendo efeitos preventivos contra danos oxidativos e também a inibição da osteoclastogênese, prevenindo a osteoporose em ratas ovariectomizadas (Feng et al., 2018). Ainda envolvendo a via PI3K/AKT, outro estudo demonstrou a ação do Resveratrol como protetor de osteoblastos, através do aumento da mitofagia mediada por SIRT1 e pela via de sinalização PI3K/AKT/mtoR, em ratos com osteoporose (Yang et al., 2019).

O tratamento com Resveratrol também foi avaliado em situações envolvendo o tabagismo. Kolkesen em 2016, investigou os efeitos do cigarro juntamente com a administração de Resveratrol em ratos expostos à fumaça do cigarro e tiveram defeitos ósseos criados em seus fêmures. Os resultados demonstraram que a fumaça do cigarro causou redução nos números de osteoblastos presentes e que nos grupos com administração do Resveratrol, houve maior número de áreas com nova formação óssea, demonstrando que o uso desse composto ajudou a reduzir os efeitos adversos causados pelo tabagismo. Além desse estudo, Franck et al., também avaliaram o efeito do Resveratrol na cicatrização óssea e sua influência na expressão de genes marcadores osteogênicos em ratos expostos à fumaça do cigarro; os autores concluíram que o Resveratrol otimizou o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico, aumentando a expressão de importantes marcadores de remodelação óssea. Ainda em estudos *in vivo* avaliando os efeitos do Resveratrol, Casarin et al., em 2014, investigaram o efeito do Resveratrol na cicatrização óssea e a sua influência na expressão de genes marcadores osteogênicos a partir de um experimento onde dois defeitos foram criados

em calvária de ratos e um implante de titânio foi inserido na tíbia desses animais, e em seguida, os ratos receberam diariamente medicação placebo ou 10 mg/kg de Resveratrol. Ao final do experimento, foi demonstrado que o grupo tratado com Resveratrol apresentou aumento dos valores de contra torque na remoção do implante comparado com o grupo controle. Houve também aumento da expressão de genes marcadores osteogênicos como *bmp2*, *bmp7* e *spp1* no grupo tratado com Resveratrol, concluindo, portanto, que o Resveratrol melhorou o reparo dos defeitos ósseos e a retenção biomecânica dos implantes. Além disso, Lameira et al. investigaram, em 2018, os efeitos da fumaça de cigarro e ingestão de Resveratrol na modulação de genes relacionados ao reparo ósseo através de mecanismos epigenéticos nos níveis globais e específicos após 30 dias da criação de defeitos em calvária de ratos. Os autores demonstraram que o Resveratrol reverte as mudanças epigenéticas e transcricionais causadas pela fumaça do cigarro em ambos os níveis, nos genes relacionados à maquinaria epigenética e à regulação óssea, enfatizando o Resveratrol como um modulador biológico para a fumaça de cigarro em ratos.

O Resveratrol também tem sido avaliado em estudos envolvendo MSCs. Em 2011, Tseng et al. investigaram os mecanismos de modulação do comprometimento das MSCs embrionárias à osteogênese ao invés da adipogênese através do tratamento com Resveratrol, e constataram que esse composto promoveu osteogênese espontânea e preveniu a adipogênese. Além disso, demonstraram que o Resveratrol aumentou a expressão de genes relacionados à linhagem osteogênica como *RUNX2*, *BGLAP* e *OCN* constatando que esses efeitos foram mediados principalmente através da via SIRT1/FOXO3A. Lv et al., em 2018, avaliaram a aplicação intermitente de Resveratrol, *in vivo*, em células indiferenciadas senescentes da medula óssea e concluíram que o tratamento aumentou a diferenciação osteogênica dessas células. Além disso, o Resveratrol também demonstrou suavizar a osteoporose através da diferenciação osteogênica de BMSCs (Chen et al., 2019), melhorar a diferenciação osteogênica de MSCs senescentes (Zhou et al., 2019) e aumentar a diferenciação osteogênica e biogênese mitocondrial de células mesenquimais derivadas do periósteo (Moon et al., 2020).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar se o Resveratrol pode aumentar o potencial osteogênico em I-PDLCs, investigando quais vias de sinalização e genes relacionados à osteogênese foram ativados. Compreender mecanismos moleculares envolvidos na formação óssea pode aprimorar abordagens clínicas de regeneração tecidual, especialmente em células que apresentam baixo potencial osteogênico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e cultura celular

As células foram coletadas a partir do ligamento periodontal de terceiros molares inclusos com indicação de exodontia, extraídos de dois pacientes entre 18 e 22 anos de idade, um do sexo masculino outro do sexo feminino, sistemicamente saudáveis, não fumantes e não gestantes, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética de Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP UNICAMP (CAAE55588816.4.0000.5418).

Para obtenção das células do ligamento periodontal (PDLC), o terço médio da raiz do dente foi raspado e em seguida digerido enzimaticamente durante 1 hora a 37 °C. Uma vez digeridas, as amostras foram filtradas para que suspensões de células únicas fossem obtidas e em seguida cultivadas em meio de biópsia – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Thermo Fisher Scientific, Cat # 11965118, EUA) – com alta glicose e suplementado com soro fetal bovino (FBS - Thermo Fisher Scientific, Cat # 12657029, EUA) a 10 % e Anti-Anti (Gibco, Cat # 15240-062, EUA) a 1 % e mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com CO₂ atmosférico a 5 %.

Após 5 dias, o meio de biópsia foi trocado por meio de crescimento celular, que consiste em DMEM, suplementado com FBS a 10 % e penicilina a 100 U/ml e estreptomicina a 100 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, Cat # 15140148, EUA). As células foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) e quando atingiram a subconfluência (7-10 dias), realizava-se a suspensão celular com solução de Tripsina – EDTA a 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, Cat #25200072, EUA) para obtenção do estoque celular, que foi congelado em meio de congelamento (Recovery Freezing Medium –Thermo Fischer Scientific, Cat #12648010, EUA) e armazenado em tanque de nitrogênio líquido.

A metodologia descrita acima está de acordo com os protocolos estabelecidos por Silvério e colaboradores (Silvério et al., 2010).

4.2 Análises de indiferenciação e multipotencialidade celular

As duas populações celulares coletadas foram caracterizadas quanto ao potencial osteogênico e adipogênico e as I-PDLCs quanto ao seu estado de indiferenciação celular.

4.2.1 Caracterização da multipotencialidade

4.2.2.1 Diferenciação osteogênica: Para determinação do potencial osteogênico, as duas populações celulares foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de $3,1 \times 10^4$ células/poço e induzidas à diferenciação osteogênica. O grupo controle e o grupo induzido à diferenciação foram plaqueados em triplicata. Após a adesão celular, foi realizado o *starvation* e 24 horas depois, a indução osteogênica foi iniciada com o meio de indução (OM) composto pelo meio de crescimento celular juntamente com ácido ascórbico na concentração de 50 mg/mL (Sigma-Aldrich, Cat #A4544, EUA), β -Glicerofosfato a 1 % (Sigma-Aldrich, Cat #G9422, EUA) e 0,1 % de 10^{-8} M de dexametasona (Sigma-Aldrich, Cat #D2915, EUA).

A diferenciação osteogênica se estendeu por 21 dias com a troca do meio osteogênico a cada 3 dias. Ao final do experimento, foi realizado o ensaio de coloração com vermelho de Alizarina (Alizarin Red – AR), no qual as células foram fixadas com etanol 70 % durante 30 minutos e em seguida coradas com solução de AR (Sigma-Aldrich, Cat # A5533, Alemanha) (AR-S 40mM, pH 4,2) por 15 minutos para que os depósitos de minerais fossem corados. A solução de AR foi retirada e as amostras lavadas cinco vezes com água destilada e uma vez com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco, sem cálcio e magnésio (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, no calcium, no magnesium* - DPBS-) (Gibco, Cat # 14190-144, EUA) para remoção de manchas não específicas.

Para a quantificação, 1mL de cloreto de cetilpiridínio a 10 % (*Cetylpyridinium Chloride* - CPC) (MP Biomedicals, Cat # 190177, França) foi adicionado em cada poço para eluir o AR-S. As amostras foram plaqueadas em uma placa de 96 poços juntamente com uma curva padrão na mesma placa. A quantificação espectrofotométrica a 562 nm foi realizada comparando as amostras com a curva padrão por meio de um leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.2.2.2 Diferenciação adipogênica: O ensaio para a diferenciação adipogênica consistiu no experimento no qual as células de ambas as populações celulares foram

plaqueadas na concentração de $3,1 \times 10^4$ células/poço, em placa de 12 poços. Os meios foram trocados a cada 3 dias, até que as células atingissem a confluência. Em seguida, a indução adipogênica foi iniciada, seguindo o protocolo de acordo com as recomendações do fabricante. A indução adipogênica consistiu em 3 ciclos de indução, sendo que em cada ciclo as células ficaram 3 dias em meio de indução e 3 dias em meio de manutenção e mais um ciclo de manutenção final de 7 dias, totalizando 25 dias. Os meios de cultura utilizados foram o *hMSC differentiation BulletKit™ – adipogenic* e o *Adipogenic maintenance medium* (ambos Lonza, Walkersville, MD, EUA). O grupo controle não sofreu estímulo para diferenciação adipogênica e foi mantido em meio de manutenção durante os mesmos 25 dias, concomitantemente ao grupo induzido. Ao término deste período, os meios de cultura foram removidos e o protocolo para coloração por Oil Red foi seguido para todos os grupos.

4.2.2 Caracterização de indiferenciação

A avaliação da indiferenciação celular foi realizada através de citometria de fluxo com citômetro de fluxo FACSCalibur conectado ao programa CellQuest, com 10^5 células/tubo. Os antígenos de superfície avaliados foram: CD105/APC, CD166/PE, CD34/FITC e CD45/PerCP (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) (Dominici et al., 2006; Seo et al., 2004).

4.3 Tempo de duplicação celular – curva de crescimento celular

O ensaio de tempo de duplicação populacional (*Population Doubling Time – PDT*) foi realizado para determinação do tempo de duplicação celular e da curva de crescimento exponencial celular das PDLCs. Para esse ensaio, 1 ml de suspensão de cada uma das populações celulares foi plaqueado em cada poço, em meio de crescimento celular em placa de 24 poços em três densidades celulares diferentes. O experimento foi repetido de forma independente duas vezes.

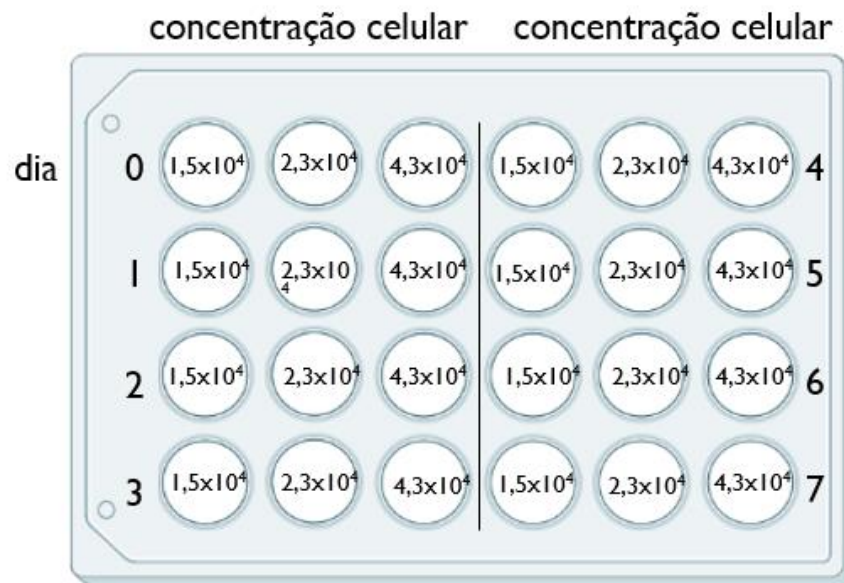


Figura 1 - Desenho esquemático do ensaio de PDT (*Population Doubling Time*). Uma placa de 24 poços foi utilizada para plaquear 1 ml de suspensão das I-PDLCs em cada poço, em meio de crescimento, em três densidades celulares diferentes, durante 7 dias. Fonte: Arquivo Pessoal.

Após a adesão celular, as células correspondentes ao tempo 0 (3 horas após o plaqueamento) foram lavadas e fixadas com solução gelada de ácido tricloroacético (*Trichloroacetic Acid* - TCA) 5 % e etanol 90 %. As demais células foram lavadas e fixadas a cada 24h, durante 7 dias. Após 7 dias, as células foram lisadas e a proliferação celular nos diferentes períodos foi determinada a partir da absorbância medida em 260 nm, que corresponde ao conteúdo total de ácidos nucleicos celulares. Os cálculos foram realizados a partir das concentrações iniciais de plaqueamento, encontrando-se o log natural $\ln(n)$ para as concentrações, para cada uma das populações celulares. Em seguida, a partir de uma regressão linear de $\ln$ (variável dependente) de cada uma das populações celulares x tempo (variável independente), encontrou-se o coeficiente linear angular da reta (μ). O cálculo do PDT foi realizado a partir da equação $g = \ln 2 / \mu$, na qual $\ln 2$ é 0.30103. A partir desse resultado, o gráfico com a curva de crescimento e o *fit* linear foi gerado. Para os cálculos, foi utilizado o programa estatístico STATA 12.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, EUA). O cálculo do PDT foi baseado em publicações anteriores (Assis et al., 2018; Assis et al., 2021).

4.4. Ensaio de viabilidade celular – Avaliação da citotoxicidade do Resveratrol

O experimento para avaliação de citotoxicidade foi realizado para determinar a concentração de Resveratrol a ser utilizada. As I-PDLCs foram plaqueadas a uma densidade de $0,5 \times 10^4$ por poço em microplacas de 96 poços e cultivadas por 24 h em estufa úmida a 37 °C contendo 5 % de CO₂. Ao atingirem a confluência, as células foram tratadas com as seguintes concentrações de Resveratrol, diluídas em meio de cultura DMEM puro: 0 µM/L, 0,1 µM/L e 1 µM/L (Anexo 1). A substituição do meio contendo Resveratrol foi feita a cada 72h. O grupo controle foi conduzido com DMEM, SFB a 10 %, suplementado com Pen/Strep. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Esse experimento se baseia na medida do possível dano que o agente em estudo pode causar ao metabolismo celular de glicídios, através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A redução do MTT (sal de tetrazólio de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadado e insolúvel em água) pelas desidrogenases mitocondriais pode ser quantificada, inferindo-se assim, sobre a viabilidade mitocondrial e, portanto, sobre a viabilidade celular. Dessa forma, a redução de MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial foi estimada comparando-se os valores de absorbância do controle com os valores de absorbância das células tratadas, sendo os valores expressos em porcentagem em relação ao controle (100 %).

4.5 Avaliação da indução osteogênica pelo Resveratrol

Foram realizados dois tipos de tratamento das células I-PDLCs com Resveratrol. No primeiro, as células foram pré-tratadas durante 72 horas com 0,1 uM de Resveratrol e em seguida iniciou-se a diferenciação osteogênica. No segundo, as células foram tratadas com 0,1 uM de Resveratrol a cada 3 dias, durante os 21 dias de indução osteogênica (Anexo 1). O pré-tratamento durante 72 horas induziu maior formação de nódulos minerais *in vitro*. Portanto, para avaliação do efeito do Resveratrol na indução osteogênica das I-PDLCs, induziu-se as células à diferenciação osteogênica durante 21 dias, de acordo com os seguintes grupos:

DMEM – grupo controle negativo: As células foram cultivadas em meio de cultura padrão (DMEM);

OM – grupo controle positivo: As células foram cultivadas em meio osteogênico;

OM/RESV – grupo teste: As células foram cultivadas em DMEM e submetidas a pré-tratamento com 0,1 μ M de Resveratrol por 3 dias, seguido da indução osteogênica (OM) por 21 dias.

O ensaio de diferenciação osteogênica e a coloração por vermelho de alizarina (AR) foram realizados conforme descrito no item **4.2.2.1**.

Para análise qualitativa utilizamos o ensaio com Xileno Orange (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), aos 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica, *in vitro*. Nesses períodos, removemos o meio de cultura e adicionamos meio OM + 10 μ M de xilenol Orange, por 14 horas (Wang et al., 2006). No dia seguinte, o meio de cultura com o xilenol foi removido, os poços lavados com PBS e realizada a fotomicrografia no microscópio Apotome (Zeiss).

4.6 Análise do RNA-seq

4.6.1 Pré-tratamento com Resveratrol

Após a detecção das PDLCs com baixo potencial osteogênico e padronização da concentração para o tratamento com Resveratrol, procedeu-se à realização de um experimento com duração de 10 dias, para coleta das células e realização do RNA-Seq, como descrito a seguir. Esse período experimental foi escolhido, baseado em resultados anteriores que sugeriram modificações epigenéticas abrangentes aos 10 dias de diferenciação osteogênica e o RNA-seq poderia explicar, a nível transcricional, as alterações observadas ao nível de DNA. As I-PDLCs foram plaqueadas em meio de cultura na densidade de 2×10^5 células em placas de 6 poços, em triplicata para cada um dos grupos, e foram incubadas durante 24 horas para a adesão celular. Em seguida, foi realizado *starvation* por mais 24 horas. Após esse período, foi realizado o tratamento com Resveratrol (Sigma-Aldrich) diluído na concentração de 0,1 μ M no meio de cultura DMEM, enquanto nos grupos controle, novo meio de crescimento celular sem Resveratrol foi adicionado. O meio de cultura contendo Resveratrol permaneceu durante 72 horas (3 dias). No terceiro dia, a diferenciação osteogênica foi iniciada e se estendeu durante 10 dias.

4.6.2 Indução osteogênica

A indução osteogênica teve duração de 10 dias, com troca do meio osteogênico (descrito no item **4.2.2.1**) a cada 3 dias nos grupos teste. No décimo dia, as amostras foram coletadas com o reagente TRIzol (Invitrogen, Cat #15596-018, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A extração do RNA total foi realizada e em seguida tratadas com solução Turbo livre de DNA para remoção de DNA genômico (Ambion, Cat #1907, EUA). As amostras foram submetidas à análise de integridade e de concentração através do bioanalisador Agilent 2100, com valor de número de integridade de RNA (RNA Integrity Number – RIN) maior que 6.

4.7 Sequenciamento do RNA (RNA-seq/Transcriptoma)

O pool de RNA das amostras foi sequenciado a partir da Tecnologia de Nova Geração (NGS), um método de sequenciamento de alto rendimento que fornece uma visão sobre o transcriptoma de uma célula ou amostra celular permitindo a quantificação da expressão gênica e a comparação desse parâmetro entre os grupos avaliados. O sequenciamento foi realizado com o kit Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina, Cat# RS-122-2002, EUA), o qual foi utilizado conforme as instruções do fabricante.

O RNA-seq consiste primeiramente na conversão das amostras de RNA em fragmentos de cDNA através da realização de uma biblioteca que é criada a partir da colocação de adaptadores em cada extremidade dos fragmentos permitindo assim o sequenciamento adequado.

4.8 Análises de Bioinformática

Uma vez realizado o sequenciamento do RNA, as leituras do transcriptoma foram alinhadas ao genoma hg19 através do programa HiSAT2. A quantificação das amostras foi feita de acordo com as últimas recomendações definidas no software DeSeq2. Foi utilizado um alinhador sem referência Salmon (Patro et al., 2017) para calcular uma contagem para cada gene, e para comparar os grupos, a tabela de contagem resultante foi processada pelo DeSeq2 (Love et al., 2014).

Os resultados de cada grupo foram submetidos às análises de Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO) para obtenção da classificação dos genes separados quanto aos processos

biológicos e funções moleculares relacionadas através do Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* - DAVID), com a remoção de termos redundantes através do REVIGO (*Reduce & Visualize Gene Ontology*) (Supek et al., 2011).

Os termos selecionados foram os 10 principais, os quais apresentavam valor de $\text{Log}_{10} p \leq 1,5$ para cada grupo analisado. As análises de GO-REVIGO foram realizadas para os genes mais expressos e menos expressos nos grupos OM e OM/RESV e os gráficos foram gerados a partir do programa RStudio. Os 10 principais termos classificados pelo $\log_{10}$ p-valor foram apresentados como gráficos de barras, realizados com a utilização do pacote *Bioconductor 3.10*. Os valores de $\log_2\text{FoldChange}$ foram utilizados para a confecção de *Heatmaps* através do pacote *Complex heatmaps package* (Gu et al., 2016) e os gráficos do tipo “Volcano plot” foram realizados a partir do pacote *Enhanced Volcano package* (Blighe et al., 2019), onde os valores de $\log_2\text{FoldChange}$ foram plotados no eixo x e o $-\log_{10}p$ -valor, no eixo y. Os genes considerados diferencialmente expressos apresentavam valor de $p \leq 0,05$ e $\log_2$ de variação > 2 (*menos expresso*) ou < -2 (*mais expresso*). Os genes com maiores magnitudes de mudança, apresentam-se mais afastados para a direita ou esquerda no eixo x. Os diagramas de Venn, representando os genes diferencialmente expressos foram realizados com a ferramenta online Interactivenn (Heberle et al., 2015).

Também foi realizada a análise de enriquecimento de conjuntos de genes (Gene set enrichment analysis - GSEA), que determina, a partir de um conjunto de genes definidos *a priori*, se existe diferença estatística significativa entre dois estados biológicos (e.g. fenótipos). Esse método difere de estratégias tradicionais de análises de expressões genéticas que focam na identificação de genes individuais, que apesar de úteis, falham em detectar processos biológicos, como vias metabólicas, programas transcricionais e respostas ao estresse, por exemplo (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005)

Essa abordagem foi realizada em nossas amostras através do software GSEA 4.1.0, o qual possui a base de dados *Molecular Signatures Database* (MSigDB), que consiste em mais de 10,915 conjuntos de genes, divididos em 9 coleções e em diversas sub-coleções. Os conjuntos de genes são definidos baseados em conhecimento biológico prévio, como por exemplo informações já publicadas sobre vias bioquímicas ou co-expressão gênica em experimentos prévios.

Dentro dos conjuntos de genes, foram escolhidos os conjuntos Hallmarks, WikiPathways, Gene Ontology (GO) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), os quais foram analisados a partir de uma lista com os genes e dados derivados do RNA-seq de nossas amostras.

Os resultados apresentados pelo GSEA baseiam-se na hipótese de que genes envolvidos em processos biológicos ou vias de sinalização similares são regulados coordenadamente. Portanto, se alguma perturbação ativa uma via, os genes dos conjuntos de genes associados serão coordenadamente mais regulados e esse padrão pode ser identificado utilizando testes estatísticos (Powers et al., 2018).

O relatório final do programa computa quatro estatísticas chave para a análise do enriquecimento dos grupos de genes: o escore de enriquecimento (ES), o escore de enriquecimento normalizado (NES), a taxa de descoberta falsa (FDR), e o p valor nominal (NOM).

O ES é o resultado primário da análise de enriquecimento, e reflete o degrau pelo qual um conjunto de genes está super-representado no topo ou no final do rank da lista de genes. Ele é calculado a partir da presença ou não de um gene da lista no conjunto de genes. Um ES positivo indica enriquecimento do conjunto de genes no topo da lista e um ES negativo indica enriquecimento ao final da lista.

Já o NES, é a estatística primária para examinar os resultados das análises. Ao normalizar o ES, o programa considera as diferenças entre os tamanhos dos conjuntos de gene e as correlações entre os conjuntos de gene e os conjuntos de dados de expressão. Portanto, o NES pode ser utilizado para comparar os resultados das análises entre os conjuntos de genes.

FDR é a probabilidade estimada que um conjunto de genes com um certo NES represente um resultado falso-positivo. Por exemplo, uma FDR de 25% indica que o resultado é provavelmente valido em 3 de 4 vezes. As análises do GSEA mostram os conjuntos de gene destacados com FDR menor que 25% como os mais prováveis para gerar hipóteses interessantes e levar a futuras pesquisas, mas também fornece resultados para todos os conjuntos de genes. Geralmente, quanto maior o NES, menor a FDR.

O NOM estima a significância estatística do ES para um conjunto específico de genes. No relatório do GSEA, um p valor de zero (0.0) indica um p valor real de menos de $1/\text{número de permutações}$. Por exemplo, se a análise realizou 100 permutações, um p valor de 0.0 indica um real valor de p valor de menos de 0,01.

Para a análise dos nossos resultados, selecionamos os processos com um NOM (nominal p value) $p\text{-valor} \leq 0,05$ e FDR (*false discovery rate*) $q\text{-valor} \leq 0,25$.

4.10 Reações de Polymerase Chain Reaction (PCR) em tempo real para análise das expressões gênicas.

Para a confirmação dos resultados foram realizadas reações de PCR em tempo real para avaliação das expressões gênicas de genes relacionados às vias de sinalização que apresentaram enriquecimento nas análises de bioinformática. Primeiramente, foi realizada a extração do RNA das amostras pelo método do TRIzol seguindo as recomendações do fabricante. Ao final do protocolo, as amostras foram ressuspensas em 25 μl de água MiliQ livre de RNase e foram armazenadas a -80°C . Para a obtenção da concentração, uma alíquota de 1 μl foi avaliada utilizando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Para a eliminação de resíduos de DNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (DNA-freeTM, Ambion Inc., Austin, TX, USA) e 1 μg da amostra foi utilizado para síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o kit “*High-capacity cDNA Reverse transcription Kit*” (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), seguindo as recomendações do fabricante, resultando em um volume final de 20 μl . As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 25°C , depois durante 2 horas a 37°C e a 85°C por 5 minutos e em seguida resfriadas a 4°C . As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da sua utilização.

Para avaliar a expressão gênica, o equipamento LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) foi utilizado juntamente com o kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA) com primers desenhados especificamente para cada gene a ser analisado. Foram utilizados 50 ng de cDNA por poço, com triplicata técnica de cada amostra, de cada um dos três experimentos independentes realizados. Para a avaliação dos dados, foi utilizado o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Schmittgen e Livak, 2008) e os resultados foram apresentados como níveis relativos dos genes alvos em relação aos genes de referência utilizados, *ACTB* e *18S*. Os genes analisados foram: *GLI1*, *PTCH1*, *SMO*, *RAB23*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *JAG1* e *HES1*. As sequências específicas e condições de corrida para cada gene estão descritas na tabela 1.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de diferenciação osteogênica, diferenciação adipogênica, fenotipagem e tempo de duplicação celular

Duas populações de PDLCs foram induzidas à diferenciação osteogênica *in vitro* para caracterização celular. Após 21 dias, foi realizado o ensaio de coloração com Vermelho de Alizarina, resultando em diferença do potencial osteogênico entre as duas populações. A população que apresentou maior capacidade de formação de nódulos minerais *in vitro* será denominada a partir de agora de h-PDLCs, e a população que apresentou menor capacidade de formação de nódulos minerais *in vitro* será denominada a partir de agora de l-PDLCs (Fig. 2 **a e b**). Houve diferença estatística significativa quando comparamos os grupos induzidos à osteogênese (OM) entre as populações ($p < 0.0001$), demonstrando a diferença entre os potenciais osteogênicos, após a indução osteogênica pelo teste t de Student (Fig. 2 **c**).

Para confirmação do potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares, h- e l-PDLCs também foram induzidas à diferenciação adipogênica, com meio adipogênico durante 25 dias com troca de meio a cada 3 dias. Os resultados demonstram a capacidade de ambas as PDLCs em se diferenciarem em células semelhantes a adipócitos, com capacidade de formação de vacúolos lipídicos, evidenciados pela coloração com Oil Red O (Fig. 3).

A análise de citometria de fluxo foi realizada para avaliação da presença/ausência de marcadores de superfície associados a células mesenquimais nas l-PDLCs. O marcador CD105 foi expresso em 34.41%, enquanto o CD166 esteve presente em 56.8 %. Ambos os marcadores de células hematopoiéticas, CD34 e CD45, não foram expressos (0.13% e 0.49 %, respectivamente) (Fig.4).

O experimento para avaliar o tempo de duplicação celular (PDT) resultou em 29.78 horas para as l-PDLCs (Fig. 4).

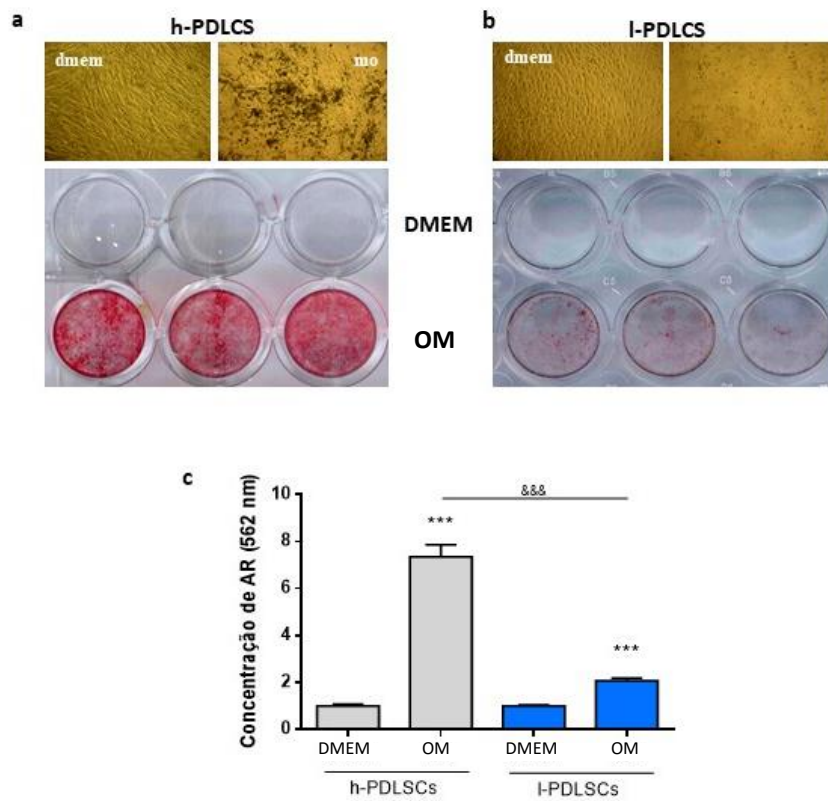


Figura 2. Diferenciação osteogênica e proliferação celular das PDLCS. PDLCS foram induzidas à diferenciação osteogênica e após 21 dias foi realizado o ensaio de coloração com o Vermelho de Alizarina demonstrando os distintos potenciais osteogênicos entre duas populações de PDLCS (a, b e c). Imagens de microscopia de luz (ampliação de 10x) (a e b), gráfico do AR (c) indica um aumento significativo na mineralização *in vitro* para o grupo OM nas duas populações de PDLCS, aos 21 dias. Entretanto, a concentração de AR foi muito maior na população h – (a) do que na l-PDLCS (b). *** indica diferença significativa entre DMEM x OM – intragrupo ($p < 0.0001$) e &&& indica diferença significativa entre OM x OM – intergrupo ($p < 0.0001$) pelo teste t de Student. AR, Vermelho de alizarina; DMEM, meio padrão (grupo controle); OM, meio osteogênico (grupo induzido à diferenciação osteogênica).

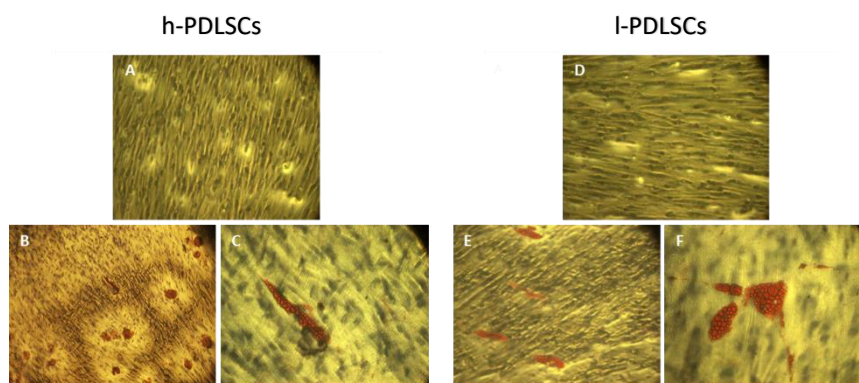


Figura 3. Diferenciação adipogênica das PDLSCs com alto e baixo potencial osteogênico. Após 25 dias de indução adipogênica, foram realizadas as colorações com Oil Red O e Haematoxilina, demonstrando células diferenciadas com vacúolos lipídicos, caracterizando o potencial adipogênico. A adipogênese foi similar entre as hPDLSCs, (A e D) h-PDLCS e l-PDLCS do grupo DMEM, não induzidas à diferenciação adipogênica. (B, C, E e F) Células positivamente coradas foram induzidas à diferenciação adipogênica. Os meios de cultura de ambos os grupos foram trocados a cada três dias. Aumento de 10x.

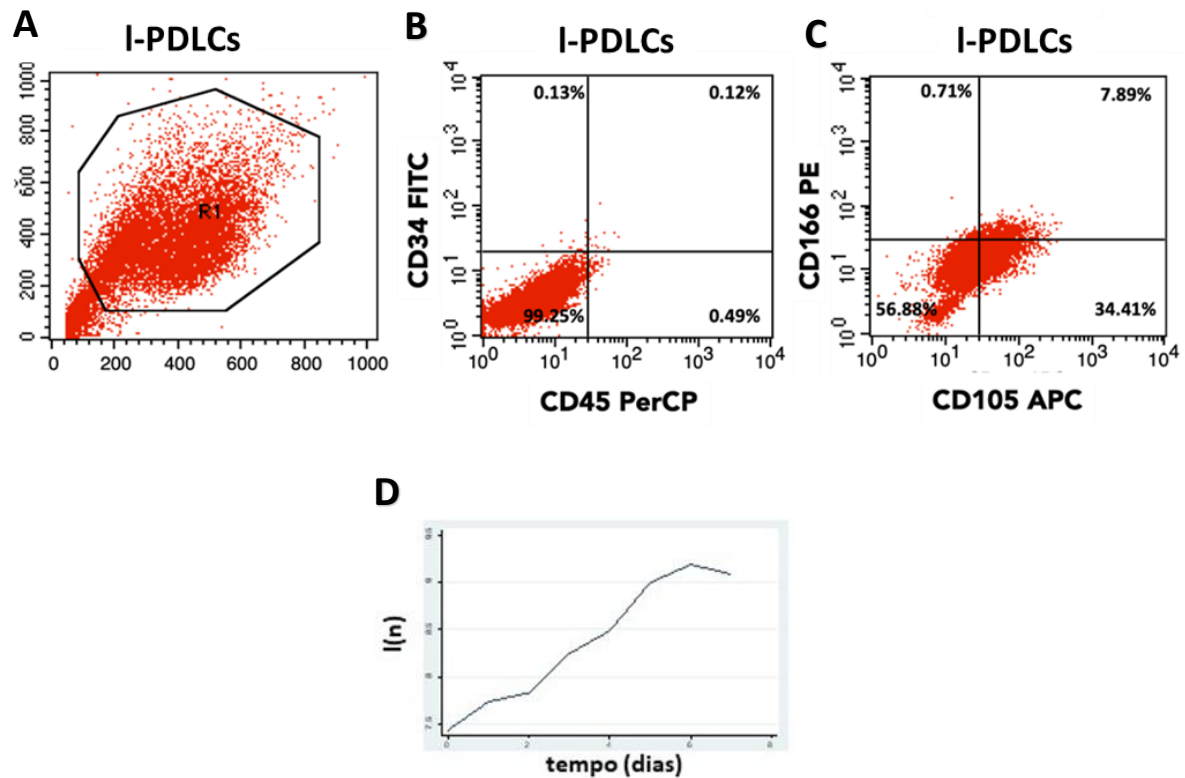


Figura 4. Caracterização de indiferenciação e determinação do tempo de duplicação celular (PDT) das I-PDLCs. Gráficos Side Scatter (SSC) e Forward Scatter (FSC) (A) demonstra a homogeneidade das I-PDLCs. Os níveis relativos de expressão de marcadores de superfície celular foram realizados por análise de citometria de fluxo e são demonstrados nos gráficos “dot plot” usando a presença/ausência de marcadores de células mesenquimais como o CD34 e CD45 (B) CD105 e CD166 (C) Os resultados são apresentados como porcentagem de células positivas em 10.000 eventos no quadrante inferior direito (RL) e as negativas no quadrante inferior esquerdo (LL). As I-PDLCs apresentaram PDT de 29.78 h (D) e os dados foram apresentados como I(n) de células semeadas em três densidades diferentes e quantificados espectrofotometricamente a 260 nm.

5.2 Ensaio Morfológico para avaliação do efeito do Resveratrol nas I-PDLCs

As I-PDLCs foram submetidas ao pré-tratamento com Resveratrol por 3 dias, seguido da indução osteogênica durante 21 dias para avaliação do seu efeito como agente osteoindutor em PDLCs com baixa capacidade de deposição de nódulos minerais *in vitro*.

O grupo pré-tratado com Resveratrol 0,1 uM durante 3 dias demonstrou aumento de deposição mineral em relação ao grupo controle sem indução osteogênica (DMEM) e em relação ao grupo controle induzido e sem tratamento com Resveratrol (OM), aos 21 dias, como demonstrado pelo ensaio morfológico com coloração por Alizarina Red e por microscopia de luz pela coloração por Xileno Orange (Fig.5).

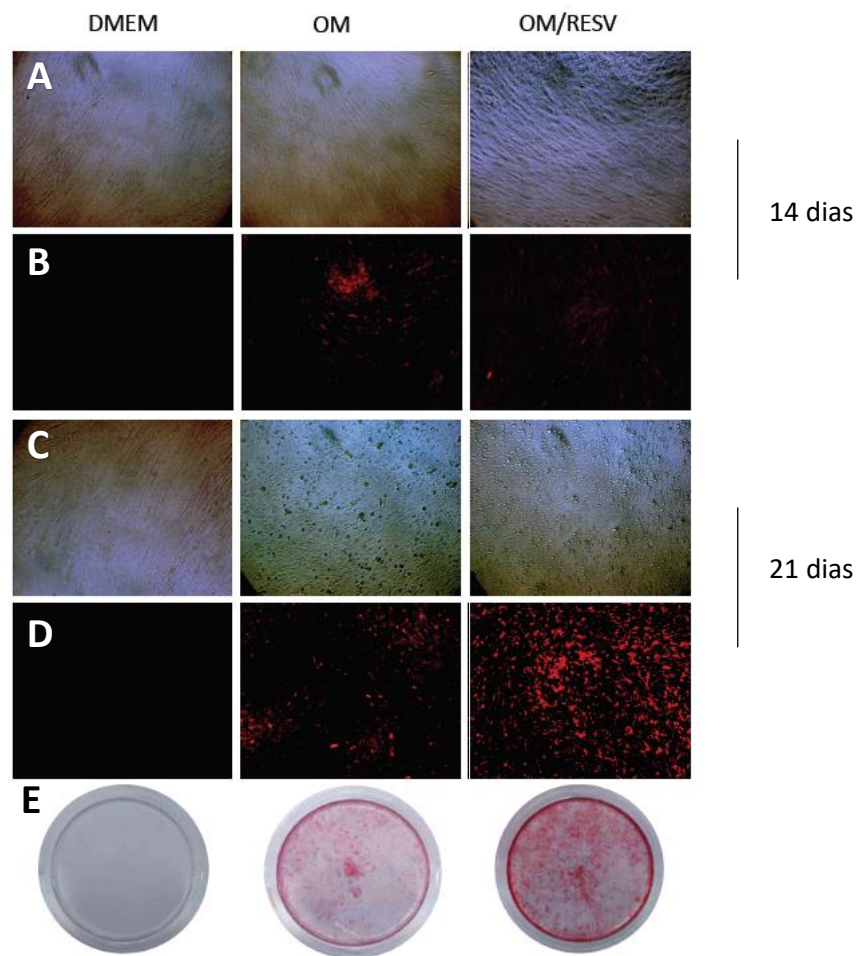


Figura 5. Diferenciação osteogênica das I-PDLCs após pré-tratamento com Resveratrol. I-PDLCs foram pré-tratadas com Resveratrol a 0,1 μ M por 72 hs e então induzidas à diferenciação osteogênica (OM/RESV) ou induzidas à diferenciação osteogênica (OM) ou não induzidas à diferenciação osteogênica (DMEM). Após 14 e 21 dias foi realizada a coloração com Xileno Orange (B, D) (ampliação de 10x) e aos 21 dias foi realizado o ensaio de coloração com o Vermelho de Alizarina, demonstrando aumento da deposição de nódulos minerais *in vitro* no grupo OM/RESV (E).

5.3 Análise global dos genes nas I-PDLCs pré-tratadas com Resveratrol após 10 dias de diferenciação osteogênica *in vitro*.

A partir do Transcriptoma gerado pelo sequenciamento das amostras das I-PDLCs, foi possível identificar 16.514 genes expressos no grupo pré-tratado com Resveratrol (OM/RESV) e no grupo controle, apenas induzido à diferenciação osteogênica (OM) durante 10 dias. Entretanto, existe diferença quanto às distribuições gênicas entre os grupos. Embora ambos os grupos apresentem similaridade na distribuição dos genes (Fig. 6A), de acordo com a magnitude de mudança da expressão dos genes (*log2FoldChange*), a significância estatística

(log10pvalor) apresenta-se superior no grupo OM, comparado ao grupo OM/RESV (Fig. 6B). Destacam-se os genes *GPSM1* e *PLA2G4B*, que estão menos expressos no grupo OM e mais expressos no grupo OM/RESV. Destaque também para os genes *ZNF788* e *SLC16A12*, negativamente modulados pelo tratamento com Resveratrol.

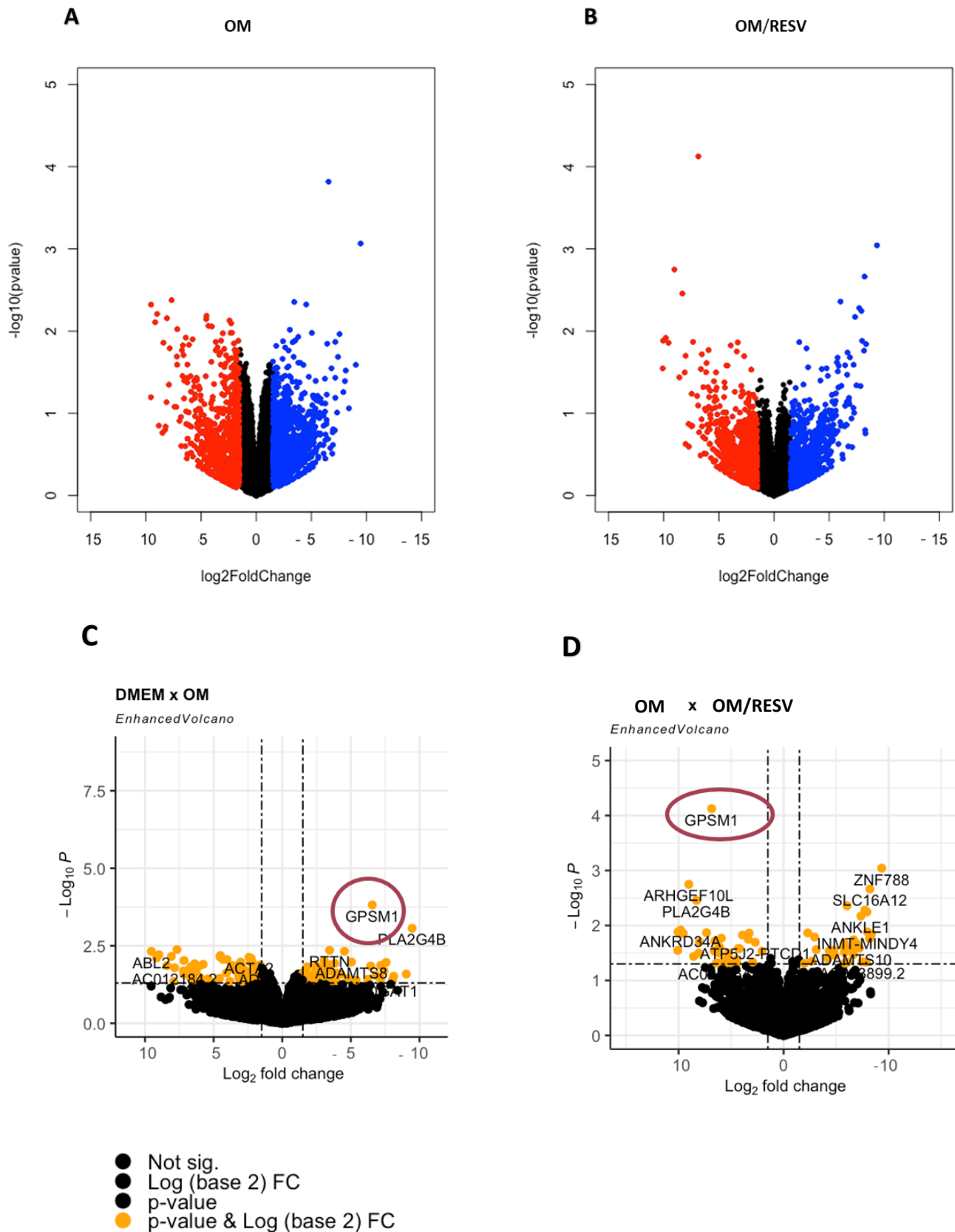


Figura 6 – Distribuição dos genes nos grupos OM e OM/RESV, após 10 dias de osteogênese *in vitro*. Os gráficos do tipo “Vulcão” ilustram a distribuição dos genes nos grupos, após 10 dias de osteogênese *in vitro*. Os pontos vermelhos (A e B) representam os genes com magnitude de mudança na expressão ($\log_2\text{FoldChange}$) < 1.5 , os pontos azuis representam os genes com magnitude de mudança na expressão $\log_2\text{FoldChange} > -1.5$, e os pontos pretos representam os genes que apresentaram $\log_2\text{FoldChange}$ entre -1.5 e 1.5 . Eixo x: $\log_2 \text{fold-change}$; eixo y: $\log_{10}\text{p-valor}$. As linhas pontilhadas horizontais (C e D) representam significância estatística ($p \leq 0.05$) e as verticais a magnitude da mudança na expressão dos genes ($\log_2 \text{fold-change} < -1.5$ ou > 1.5). Os pontos amarelos representam os genes considerados diferencialmente expressos nas I-PDLCs após o pré-tratamento com Resveratrol e a diferenciação osteogênica.

5.4 Análise dos genes diferencialmente expressos (DGEs) nos grupos OM e OM/RESV após 10 dias de indução osteogênica *in vitro*.

Nas análises subsequentes, as comparações realizadas foram as seguintes: DMEM x OM, para observar as mudanças ocorridas no grupo OM em comparação ao grupo DMEM e OM x OM/RESV, para observar as mudanças ocorridas no grupo OM/RESV em comparação ao grupo OM.

Os genes diferencialmente expressos (DGEs) foram definidos a partir do valor de $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado e quando esse valor era < -1.5 ou > 1.5 , o gene era considerado diferencialmente expresso. Foram identificados 915 DGEs no grupo OM e 834 no grupo OM/RESV e, em comum, 48 genes (Fig. 7A). Os DGEs foram submetidos à análise de GO (Gene Ontology – Ontologia Gênica) para processos biológicos e funções moleculares: entre os DGEs em comum para os grupos, pode-se destacar a função molecular “*transporter activity*” (Fig. 7C); entre os 834 DGEs apresentados no grupo OM/RESV, podemos destacar os processos biológicos “*transmembrane transport*” e “*regulation of ion transmembrane transport*” e as funções moleculares “*receptor binding*” e “*potassium channel regulation activity*” (Fig. 8). Entre os 915 DGEs do grupo OM, os processos biológicos que podem ser destacados são “*cell-cell signaling*” e “*cell differentiation*”, e as funções moleculares “*receptor binding*” e “*transmembrane signaling receptor activity*” (Fig. 9).

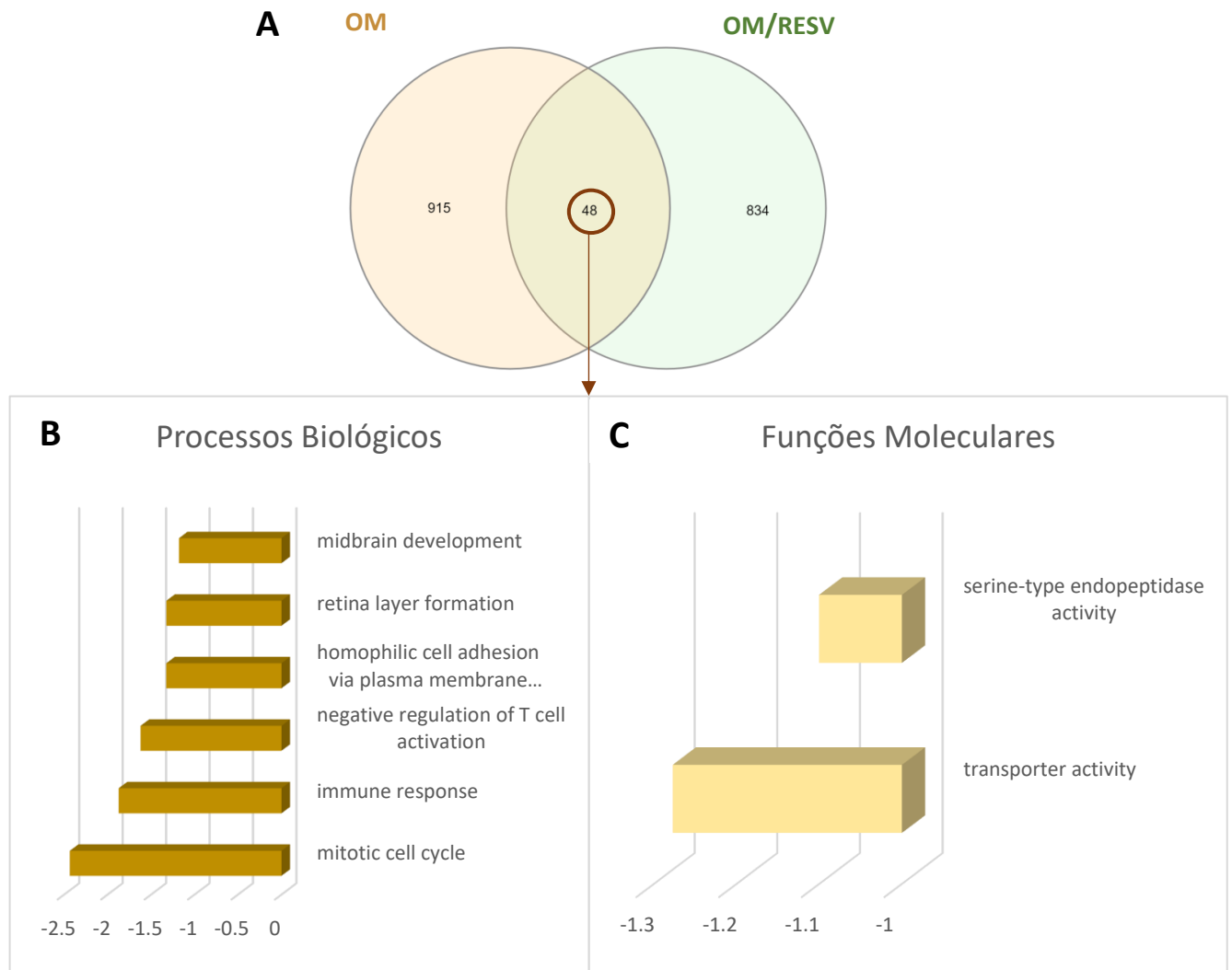


Figura 7 – DGEs, processos biológicos e funções moleculares compartilhadas entre os grupos OM e OM/RESV aos 10 dias de indução osteogênica *in vitro*. O Diagrama de Venn (A) mostra (destaque em vermelho) a quantidade de DGEs em comum entre os grupos aos 10 dias de osteogênese *in vitro*. Os resultados das análises de GO estão representados nos gráficos de barras e mostram os termos enriquecidos para os processos biológicos (B) e funções moleculares (C) que apresentaram $\log_{10}$ p-valor < 1.0 e que foram mais representados em comum entre os grupos.

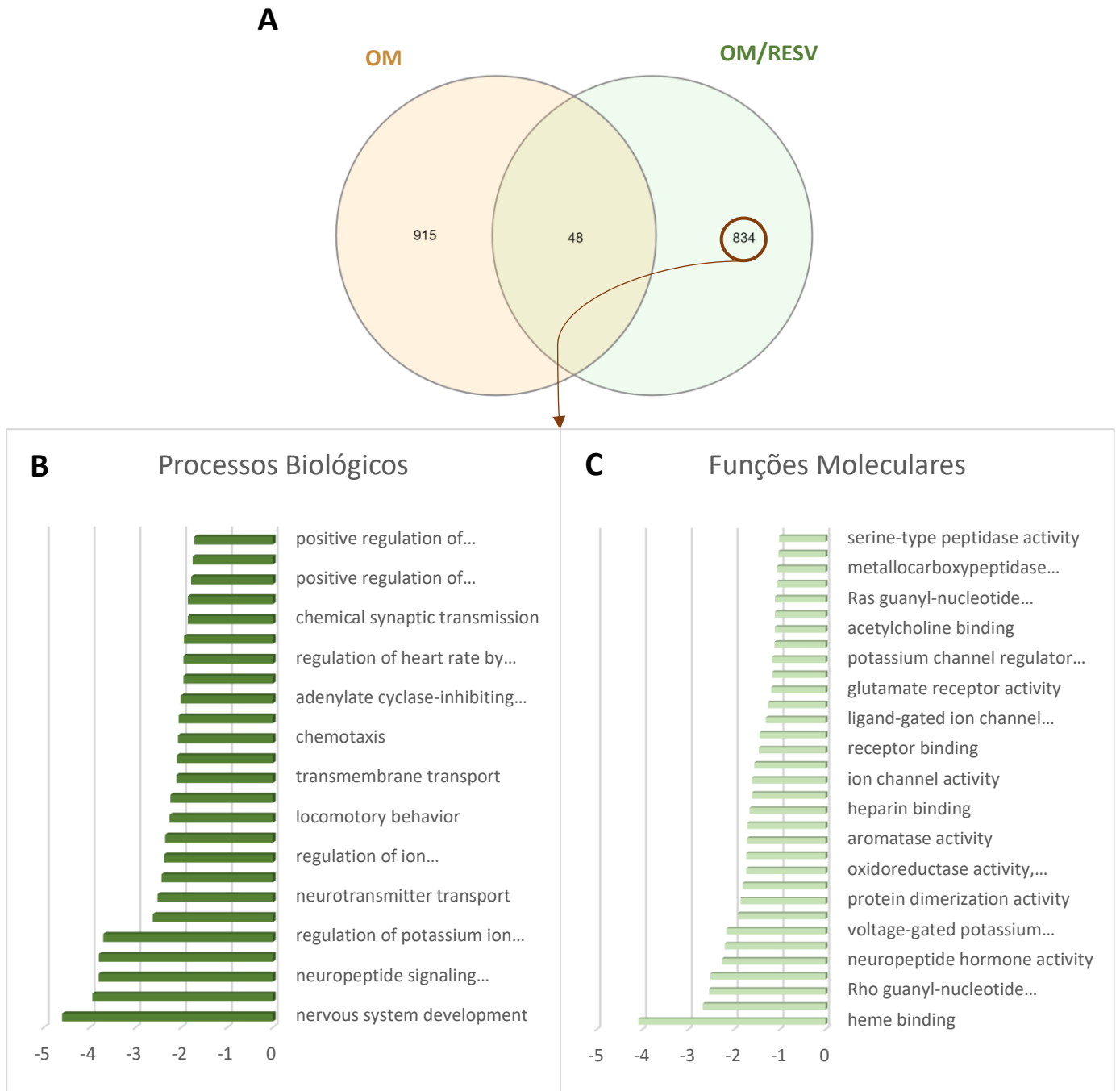


Figura 8 – DGEs, Processos biológicos e Funções moleculares no grupo OM/RESV aos 10 dias de indução osteogênica *in vitro*. O Diagrama de Venn (A) mostra (destaque em vermelho) a quantidade de DGEs no grupo OM aos 10 dias de osteogênese *in vitro*. Os resultados das análises de GO estão representados nos gráficos de barras e mostram os termos enriquecidos para os processos biológicos (B) e funções moleculares (C) que apresentaram $\log_{10} p\text{-valor} < 1.0$ e que foram mais representados somente no grupo OM.

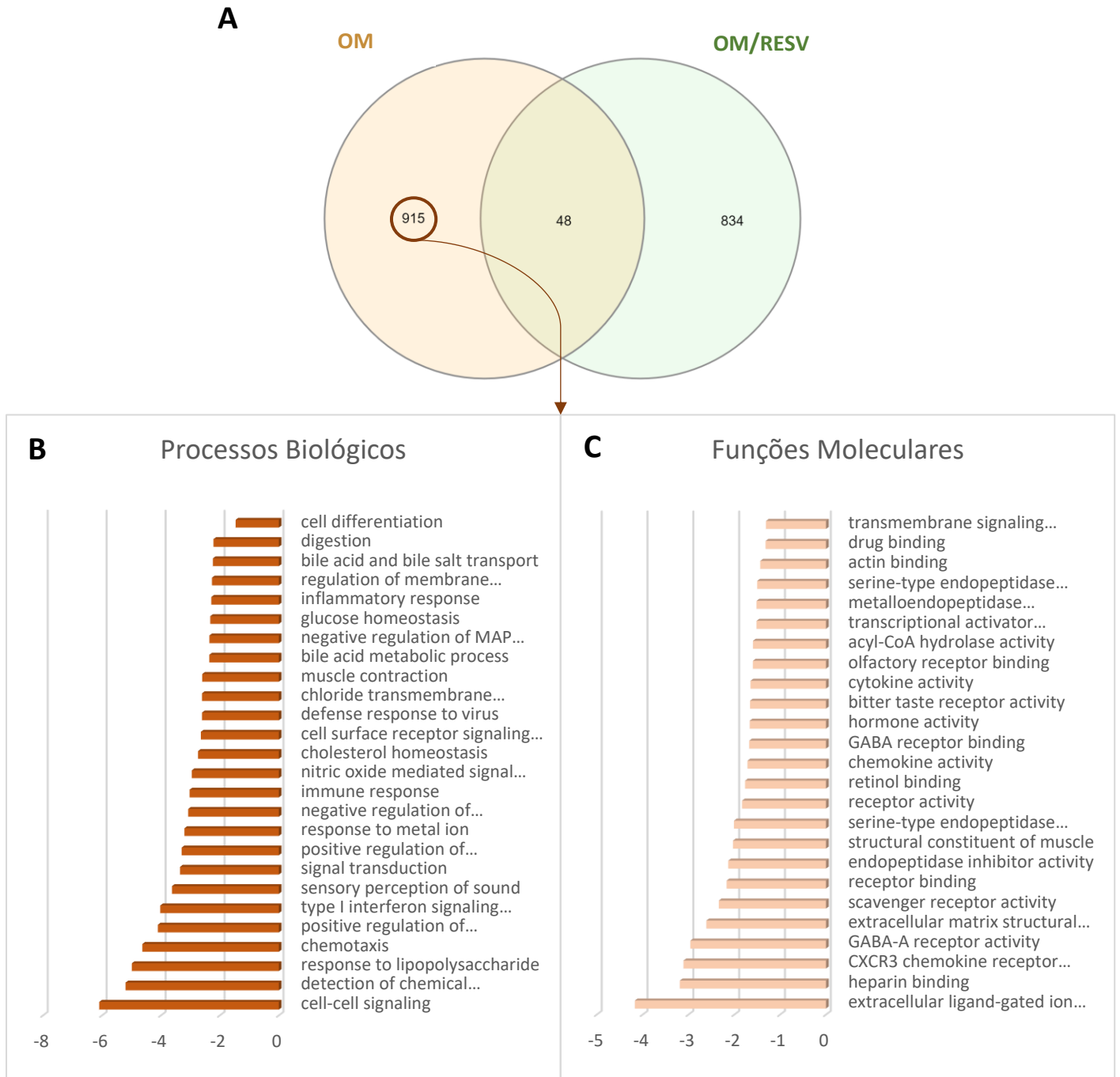


Figura 9 – DGEs, Processos biológicos e Funções moleculares no grupo OM aos 10 dias de indução osteogênica *in vitro*. O Diagrama de Venn (A) mostra (destaque em vermelho) a quantidade de DGEs no grupo OM/RESV aos 10 dias de osteogênese *in vitro*. Os resultados das análises de GO estão representados nos gráficos de barras e mostram os termos enriquecidos para os processos biológicos (B) e funções moleculares (C) que apresentaram $\log_{10}$ p-valor < 1.0 e que foram mais representados somente no grupo OM/RESV.

osteogênese *in vitro*, durante 10 dias, de acordo com o *log2FoldChange* apresentado. Nos destaques estão os genes mais inversamente expressos entre OM/RESV e OM. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os menos expressos de acordo com a intensidade demonstrada na escala ao lado do *Heatmap*.

5.6 Análise dos perfis transcricionais dos genes relacionados às principais vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica.

Durante a diferenciação osteogênica, diversas vias de sinalização são ativadas para que o fenótipo final seja obtido. Dentre essas vias, as principais e mais estudadas são as vias TGF- β /BMP, Ca²⁺, FGF (*Fibroblast Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*) e Wnt (canônica, não-canônica). Ao analisar o perfil transcricional dos grupos em relação às vias de sinalização, é possível notar perfis transcricionais diferentes entre OM e OM/RESV (Fig. 11).

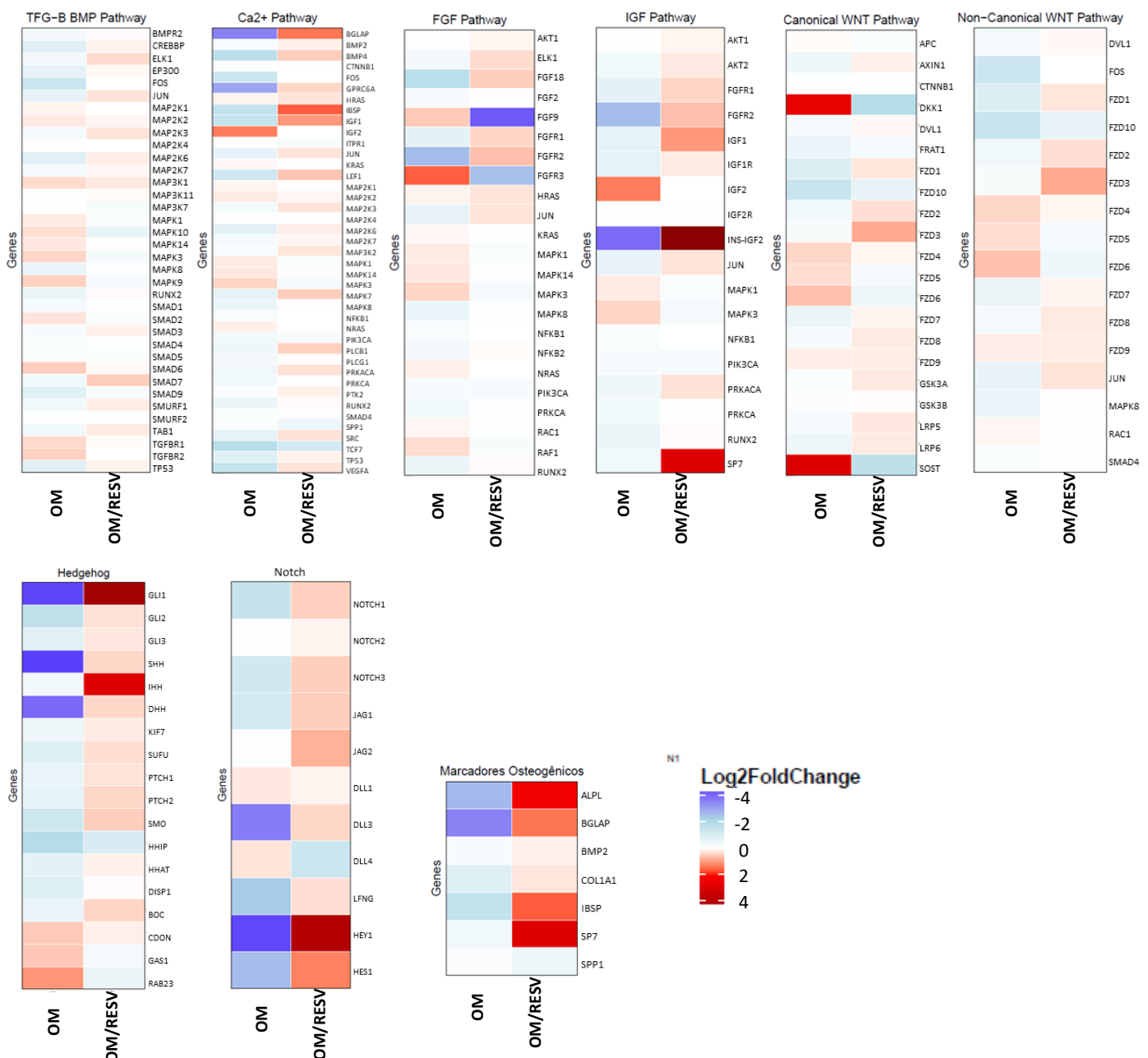


Figura 11 – Perfis transcricionais dos genes relacionados às principais vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica. Os *Heatmaps* mostram os genes relacionados às principais vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica, de acordo com o *log2FoldChange* apresentado. Os retângulos alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

5.7 Análise dos perfis funcionais dos genes identificados através do Transcriptoma

Através das análises realizadas pelo programa GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), foi possível obter resultados demonstrando quais conjuntos de genes foram enriquecidos no grupo OM/RESV ao compará-lo com o grupo OM. As análises realizadas foram *Hallmarks*, *KEGG* e *WikiPathways*. Dentre os resultados, as vias de sinalização que obtiveram destaque foram as vias Notch e Hedgehog (Hh).

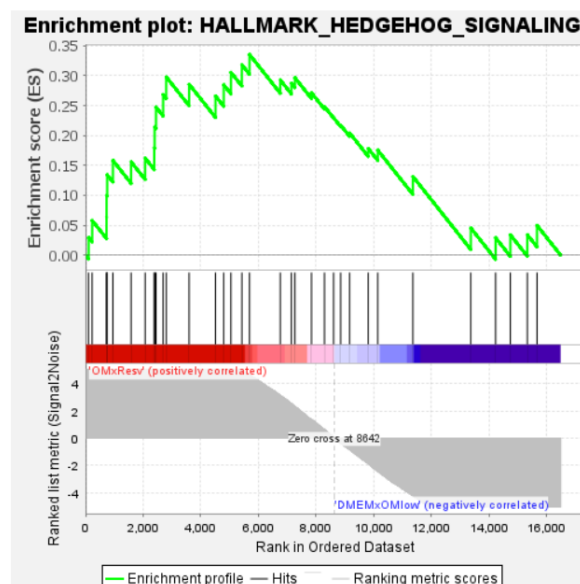
Ambos os conjuntos de genes relacionados às vias Hh e Notch apresentaram resultados significativos nas análises realizadas. A via Hh, após a análise de *Hallmarks*, ficou classificada em primeiro lugar no ranqueamento dos conjuntos enriquecidos e apresentou NOM p-valor = 0,02, FDR q-valor = 0,149 e ES = 0,33 (Fig. 12 A); na análise KEGG, apresentou NOM p-valor = 0,003, FDR q-valor = 0,06 e ES = 0,322 (Fig. 13 A); nas análises *WikiPathways*, apresentou NOM p-valor = 0,0, FDR q-valor = 0,033 e ES = 0,37 (Fig. 14 A).

Em relação ao conjunto de genes associado à via Notch, a análise de *Hallmarks* resultou em NOM p-valor = 0,019, FDR q-valor = 0,07 e ES = 0,33 (Fig. 15 A); na análise KEGG, apresentou NOM p-valor = 0,007, FDR q-valor = 0,07 e ES = 0,31 (Fig. 16 A) e nas análises *WikiPathways* NOM p-valor = 0,02, FDR q-valor = 0,21 e ES = 0,287 (Fig. 17 A).

A

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING
Enrichment Score (ES)	0.33528247
Normalized Enrichment Score (NES)	1.7132965
Nominal p-value	0.027881041
FDR q-value	0.14978935
FWER p-Value	0.179

B



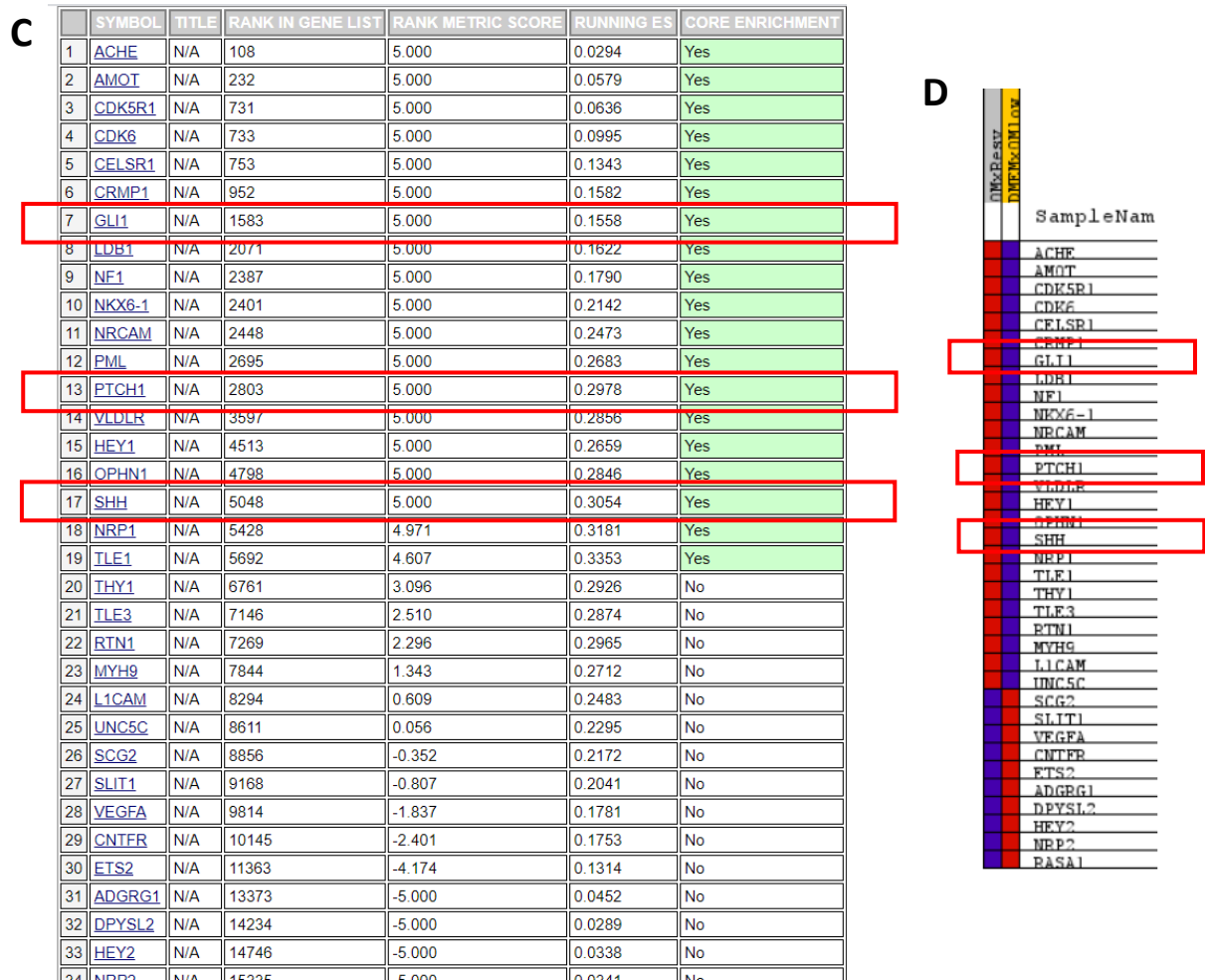
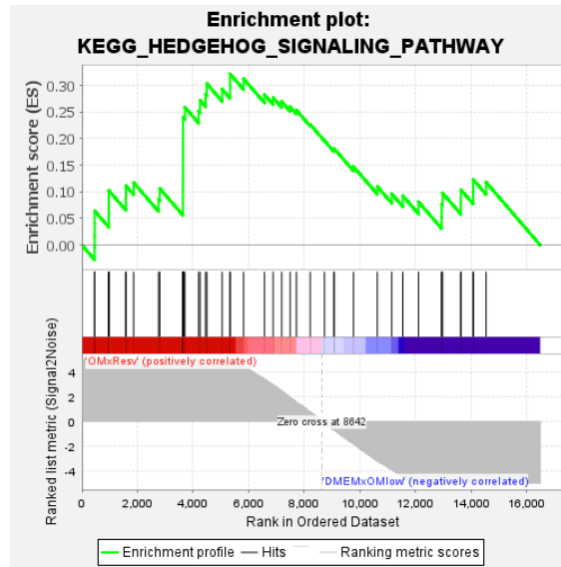


Figura 12 – Enriquecimento e classificação, tabela e *Heatmap* contendo os genes pertencentes a via de sinalização Hedgehog, pelo banco de dados *Hallmarks*. Os resultados da análise de *Hallmarks* mostraram que as via de sinalização Hedgehog (**B**) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. O painel inferior mostra as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (**C**) e o *Heatmap* (**D**) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se os valores $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

A

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	KEGG_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY
Enrichment Score (ES)	0.32212037
Normalized Enrichment Score (NES)	1.8575555
Nominal p-value	0.003816794
FDR q-value	0.06365477
FWER p-Value	0.37

B



C

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
1	BMP2	N/A	459	5.000	-0.0049	Yes
2	BMP4	N/A	461	5.000	0.0181	Yes
3	BMP8A	N/A	462	5.000	0.0411	Yes
4	BMP8B	N/A	463	5.000	0.0641	Yes
5	CSNK1D	N/A	967	5.000	0.0566	Yes
6	CSNK1G1	N/A	968	5.000	0.0796	Yes
7	CSNK1G3	N/A	969	5.000	0.1026	Yes
8	GLI1	N/A	1583	5.000	0.0884	Yes
9	GLI3	N/A	1584	5.000	0.1114	Yes
10	IHH	N/A	1863	5.000	0.1175	Yes
11	PRKACA	N/A	2769	5.000	0.0861	Yes
12	PITCH1	N/A	2803	5.000	0.1065	Yes
13	WNT10B	N/A	3634	5.000	0.0791	Yes
14	WNT16	N/A	3635	5.000	0.1021	Yes
15	WNT2	N/A	3636	5.000	0.1251	Yes
16	WNT5A	N/A	3637	5.000	0.1482	Yes
17	WNT5B	N/A	3638	5.000	0.1712	Yes
18	WNT7A	N/A	3639	5.000	0.1942	Yes
19	WNT7B	N/A	3640	5.000	0.2173	Yes
20	WNT8B	N/A	3641	5.000	0.2403	Yes
21	ZIC2	N/A	3709	5.000	0.2593	Yes
22	CSNK1E	N/A	4300	5.000	0.2626	Yes
23	DHH	N/A	4252	5.000	0.2724	Yes
24	GLI2	N/A	4451	5.000	0.2834	Yes
25	CSK3B	N/A	4494	5.000	0.3036	Yes
26	SHH	N/A	5048	5.000	0.2933	Yes
27	WNT11	N/A	5332	5.000	0.2991	Yes
28	WNT4	N/A	5333	5.000	0.3221	Yes
29	WNT3	N/A	5816	4.434	0.3132	No
30	FBXW11	N/A	6569	3.395	0.2831	No
31	WNT2B	N/A	6881	2.924	0.2777	No
32	PITCH2	N/A	7190	2.420	0.2701	No
33	WNT9A	N/A	7494	1.908	0.2604	No
34	HHIP	N/A	7720	1.520	0.2537	No
35	STK36	N/A	8217	0.731	0.2269	No
36	LRP2	N/A	8728	-0.150	0.1966	No
37	BMP5	N/A	9065	-0.667	0.1792	No
38	SMO	N/A	9085	-0.694	0.1813	No
39	CSNK1A1	N/A	9774	-1.771	0.1476	No
40	SUFU	N/A	10630	-3.156	0.1101	No
41	WNT10A	N/A	11151	-3.882	0.0964	No
42	WNT9B	N/A	11547	-4.433	0.0927	No
43	BTRC	N/A	12115	-5.000	0.0813	No
44	PRKACB	N/A	12944	-5.000	0.0539	No
45	PRKY	N/A	12947	-5.000	0.0769	No
46	RAB23	N/A	12977	-5.000	0.0981	No
47	BMP6	N/A	13636	-5.000	0.0811	No
48	BMP7	N/A	13637	-5.000	0.1042	No
49	CSNK1A1L	N/A	14080	-5.000	0.1003	No
50	CSNK1G2	N/A	14081	-5.000	0.1233	No
51	GAS1	N/A	14544	-5.000	0.1183	No

D

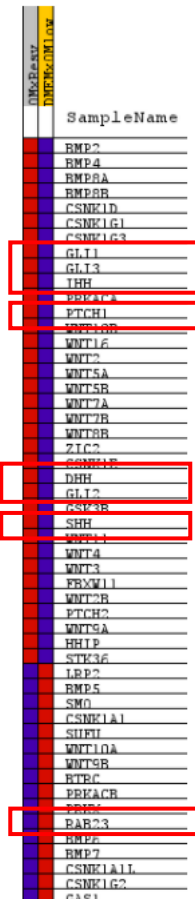
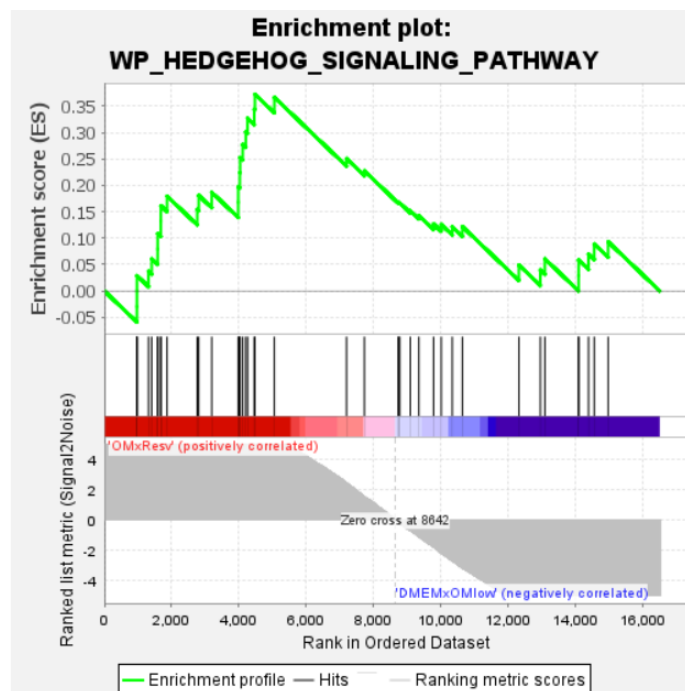


Figura 13. Enriquecimento e classificação, tabela e *Heatmap* contendo os genes pertencentes a via de sinalização Hedgehog, pelo banco de dados Kegg. Os resultados da análise de Kegg mostraram que a via de sinalização Hedgehog (**B**) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. O painel inferior mostra as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (**C**) e o *Heatmap* (**D**) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se o valor $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

A*Table: GSEA Results Summary*

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	WP_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY
Enrichment Score (ES)	0.37237385
Normalized Enrichment Score (NES)	2.0359018
Nominal p-value	0.0
FDR q-value	0.03342655
FWER p-Value	0.253

B

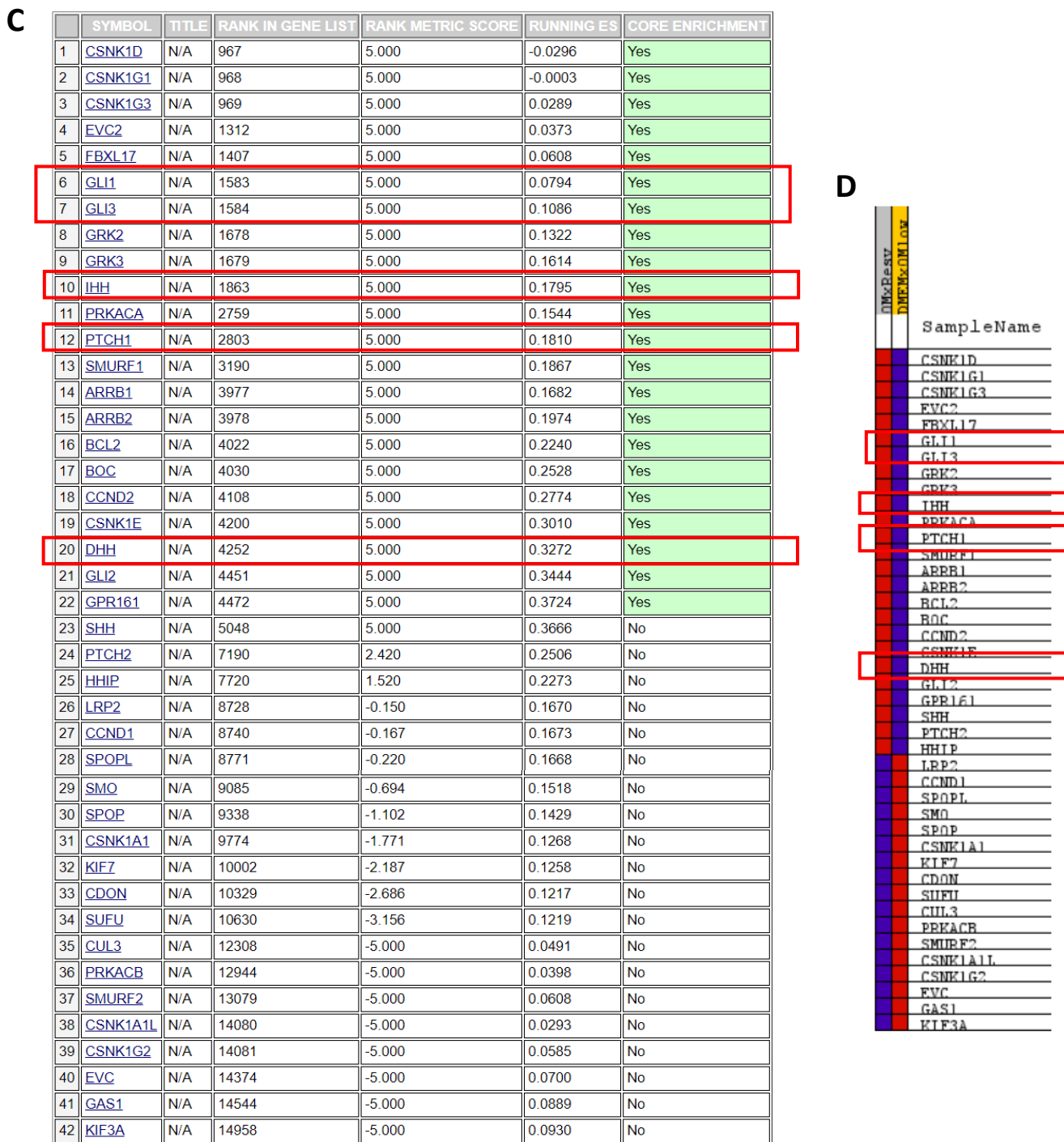
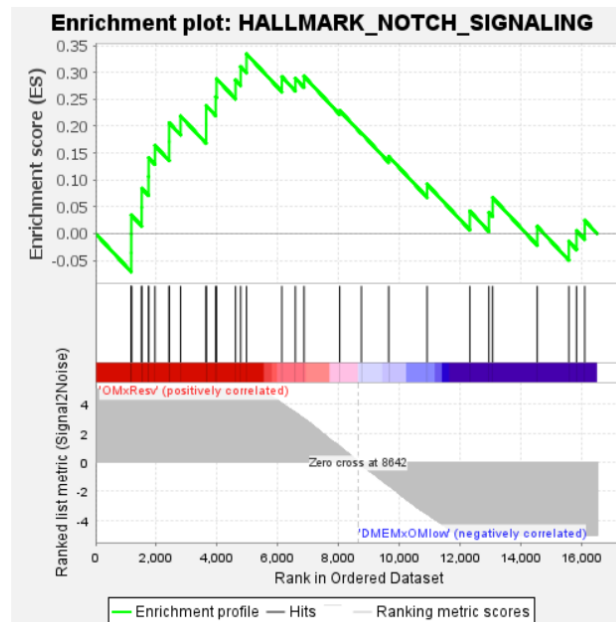


Figura 14 – Enriquecimento e classificação, tabela e Heatmap contendo os genes pertencentes a via de sinalização Hedgehog, pelo banco de dados Wikipathways. Os resultados da análise de Wikipathways mostraram que a via de sinalização Hedgehog (B) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. Os painéis inferiores mostram as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (C) e o Heatmap (D) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se o valor $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

A*Table: GSEA Results Summary*

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	HALLMARK_NOTCH_SIGNALING
Enrichment Score (ES)	0.33465907
Normalized Enrichment Score (NES)	1.6880953
Nominal p-value	0.019157087
FDR q-value	0.07695788
FWER p-Value	0.177

B

C

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
1	DTX1	N/A	1172	5.000	-0.0359	Yes
2	DTX2	N/A	1173	5.000	-0.0006	Yes
3	DTX4	N/A	1175	5.000	0.0346	Yes
4	FZD1	N/A	1516	5.000	0.0492	Yes
5	FZD7	N/A	1519	5.000	0.0844	Yes
6	HES1	N/A	1741	5.000	0.1062	Yes
7	HEYL	N/A	1745	5.000	0.1413	Yes
8	KAT2A	N/A	1953	5.000	0.1640	Yes
9	NOTCH2	N/A	2420	5.000	0.1710	Yes
10	NOTCH3	N/A	2421	5.000	0.2063	Yes
11	PSENEN	N/A	2794	5.000	0.2190	Yes
12	WNT2	N/A	3636	5.000	0.2032	Yes
13	WNT5A	N/A	3637	5.000	0.2384	Yes
14	APH1A	N/A	3950	5.000	0.2548	Yes
15	APBB1	N/A	3977	5.000	0.2885	Yes
16	JAG1	N/A	4601	5.000	0.2859	Yes
17	NOTCH1	N/A	4770	5.000	0.3110	Yes
18	RBX1	N/A	4962	5.000	0.3347	Yes
19	LFNG	N/A	6125	4.012	0.2924	No
20	FBXW11	N/A	6569	3.395	0.2894	No
21	PSEN2	N/A	6855	2.963	0.2930	No
22	MAML2	N/A	8027	1.059	0.2293	No
23	CCND1	N/A	8740	-0.167	0.1872	No
24	DLL1	N/A	9639	-1.589	0.1439	No
25	ST3GAL6	N/A	10901	-3.516	0.0921	No
26	CUL1	N/A	12307	-5.000	0.0420	No
27	PPARD	N/A	12933	-5.000	0.0393	No
28	SKP1	N/A	13056	-5.000	0.0672	No
29	FZD5	N/A	14523	-5.000	0.0134	No
30	PRKCA	N/A	15563	-5.000	-0.0145	No
31	SAP30	N/A	15815	-5.000	0.0055	No
32	TCF7L2	N/A	16085	-5.000	0.0245	No

D

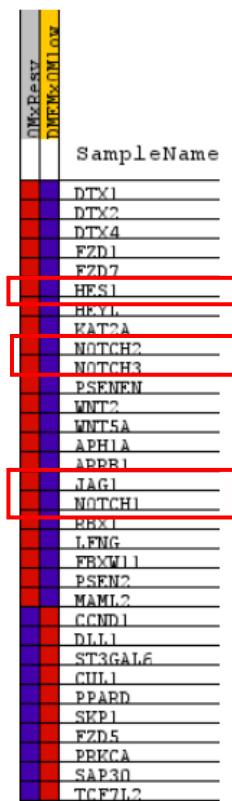
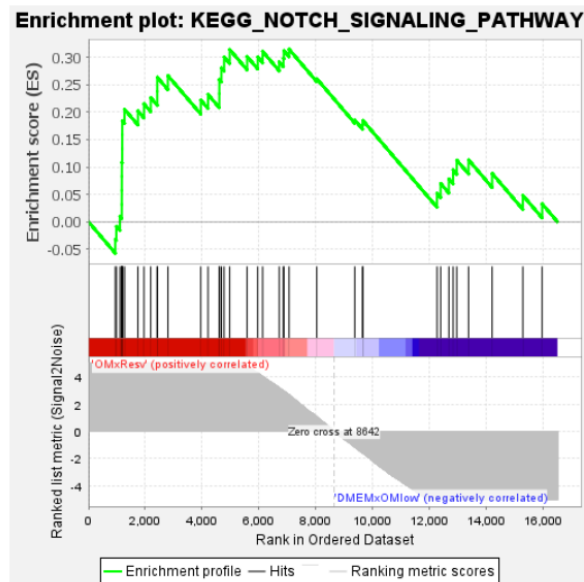


Figura 15 - Enriquecimento e classificação, tabela e *Heatmap* contendo os genes pertencentes a via de sinalização Notch, pelo banco de dados *Hallmarks*. Os resultados da análise mostraram que a via de sinalização Notch (B) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. O painel inferior mostra as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (C) e o *Heatmap* (D) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se os valores $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

A

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	KEGG_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY
Enrichment Score (ES)	0.31469873
Normalized Enrichment Score (NES)	1.7459668
Nominal p-value	0.0075046904
FDR q-value	0.07539885
FWER p-Value	0.631

B



51

C

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
1	CREBBP	N/A	944	5.000	-0.0318	Yes
2	CTBP2	N/A	980	5.000	0.0083	Yes
3	DLL3	N/A	1107	5.000	0.0097	Yes
4	DTX1	N/A	1172	5.000	0.0314	Yes
5	DTX2	N/A	1173	5.000	0.0570	Yes
6	DTX3	N/A	1174	5.000	0.0826	Yes
7	DTX4	N/A	1175	5.000	0.1083	Yes
8	DVL1	N/A	1188	5.000	0.1331	Yes
9	DVL2	N/A	1189	5.000	0.1588	Yes
10	DVL3	N/A	1190	5.000	0.1844	Yes
11	EP300	N/A	1269	5.000	0.2053	Yes
12	HES1	N/A	1741	5.000	0.2022	Yes
13	KAT2A	N/A	1953	5.000	0.2150	Yes
14	MAML3	N/A	2189	5.000	0.2264	Yes
15	NOTCH2	N/A	2420	5.000	0.2380	Yes
16	NOTCH3	N/A	2421	5.000	0.2636	Yes
17	PSENEN	N/A	2794	5.000	0.2666	Yes
18	APH1A	N/A	3950	5.000	0.2220	Yes
19	CTBP1	N/A	4205	5.000	0.2322	Yes
20	JAG1	N/A	4601	5.000	0.2338	Yes
21	JAG2	N/A	4602	5.000	0.2594	Yes
22	MAML1	N/A	4674	5.000	0.2807	Yes
23	NOTCH1	N/A	4770	5.000	0.3005	Yes
24	RFNG	N/A	4967	5.000	0.3143	Yes
25	RBPJ	N/A	5578	4.755	0.3015	Yes
26	MFNG	N/A	5951	4.259	0.3007	Yes
27	LFNG	N/A	6125	4.012	0.3108	Yes
28	NUMB	N/A	6705	3.184	0.2919	Yes
29	PSEN2	N/A	6855	2.963	0.2980	Yes
30	RBPJL	N/A	6870	2.941	0.3122	Yes
31	NUMBL	N/A	7055	2.668	0.3147	Yes
32	MAML2	N/A	8027	1.059	0.2611	No
33	HDAC2	N/A	9364	-1.133	0.1856	No
34	DLL1	N/A	9639	-1.589	0.1771	No
35	HDAC1	N/A	9647	-1.594	0.1849	No
36	CIR1	N/A	12255	-5.000	0.0520	No
37	DTX3L	N/A	12383	-5.000	0.0699	No
38	KAT2B	N/A	12672	-5.000	0.0780	No
39	NCOR2	N/A	12821	-5.000	0.0946	No
40	PSEN1	N/A	12950	-5.000	0.1124	No
41	ADAM17	N/A	13365	-5.000	0.1129	No
42	DLL4	N/A	14194	-5.000	0.0881	No
43	NCSTN	N/A	15274	-5.000	0.0481	No
44	SNW1	N/A	15951	-5.000	0.0327	No

D

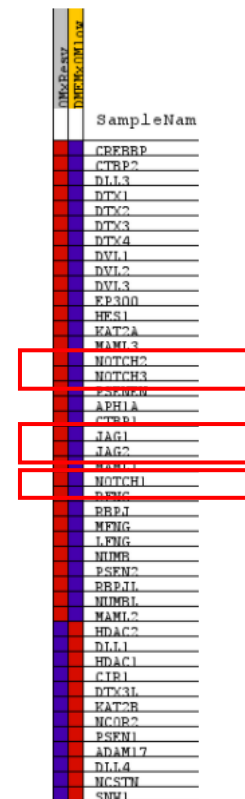
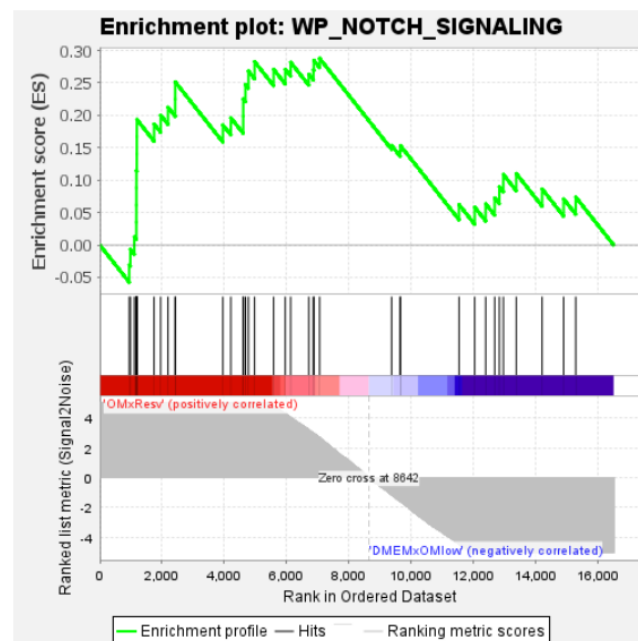


Figura 16 - Enriquecimento e classificação, tabela e Heatmap contendo os genes pertencentes a via de sinalização Notch, pelo banco de dados Kegg. Os resultados da análise de Kegg mostraram que a via de sinalização Notch (B) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. O painel inferior mostra as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (C) e o Heatmap (D) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se o valor $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

A

Dataset	hg19_HiSAT_omresv_dmemom_numerosinvertidos.hg19_omresv_dmemom.cls.txt #OMxResv_versus_DMExOMlow
Phenotype	hg19_omresv_dmemom.cls.txt#OMxResv_versus_DMExOMlow
Upregulated in class	OMxResv
GeneSet	WP_NOTCH_SIGNALING
Enrichment Score (ES)	0.28776076
Normalized Enrichment Score (NES)	1.5906372
Nominal p-value	0.025089607
FDR q-value	0.2198993
FWER p-Value	0.998

B



C

	SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
1	CREBBP	N/A	944	5.000	-0.0309	Yes
2	CTBP2	N/A	980	5.000	-0.0065	Yes
3	DLL3	N/A	1107	5.000	0.0124	Yes
4	DTX1	N/A	1172	5.000	0.0350	Yes
5	DTX2	N/A	1173	5.000	0.0615	Yes
6	DTX3	N/A	1174	5.000	0.0881	Yes
7	DTX4	N/A	1175	5.000	0.1146	Yes
8	DVL1	N/A	1188	5.000	0.1404	Yes
9	DVL2	N/A	1189	5.000	0.1669	Yes
10	DVL3	N/A	1190	5.000	0.1934	Yes
11	HES1	N/A	1741	5.000	0.1865	Yes
12	KAT2A	N/A	1953	5.000	0.2002	Yes
13	MAML3	N/A	2189	5.000	0.2125	Yes
14	NOTCH2	N/A	2420	5.000	0.2250	Yes
15	NOTCH3	N/A	2421	5.000	0.2515	Yes
16	APH1A	N/A	3950	5.000	0.1851	Yes
17	CTBP1	N/A	4205	5.000	0.1962	Yes
18	JAG1	N/A	4601	5.000	0.1987	Yes
19	JAG2	N/A	4602	5.000	0.2253	Yes
20	MAML1	N/A	4674	5.000	0.2475	Yes
21	NOTCH1	N/A	4770	5.000	0.2682	Yes
22	RFNG	N/A	4967	5.000	0.2828	Yes
23	RBPJ	N/A	5578	4.755	0.2710	Yes
24	MFNG	N/A	5951	4.259	0.2709	Yes
25	LFNG	N/A	6125	4.012	0.2817	Yes
26	NUMB	N/A	6705	3.184	0.2634	Yes
27	PSEN2	N/A	6855	2.963	0.2700	Yes
28	RBPJL	N/A	6870	2.941	0.2848	Yes
29	NUMBL	N/A	7055	2.668	0.2878	Yes
30	HDAC2	N/A	9364	-1.133	0.1534	No
31	DLL1	N/A	9639	-1.589	0.1452	No
32	HDAC1	N/A	9647	-1.594	0.1532	No
33	KCNJ5	N/A	11528	-4.406	0.0623	No
34	APH1B	N/A	12030	-5.000	0.0584	No
35	DTX3L	N/A	12383	-5.000	0.0635	No
36	KAT2B	N/A	12672	-5.000	0.0725	No
37	NCOR2	N/A	12821	-5.000	0.0900	No
38	PSEN1	N/A	12950	-5.000	0.1088	No
39	ADAM17	N/A	13365	-5.000	0.1101	No
40	DLL4	N/A	14194	-5.000	0.0863	No
41	INPP5K	N/A	14884	-5.000	0.0709	No
42	NCSTN	N/A	15274	-5.000	0.0738	No

D

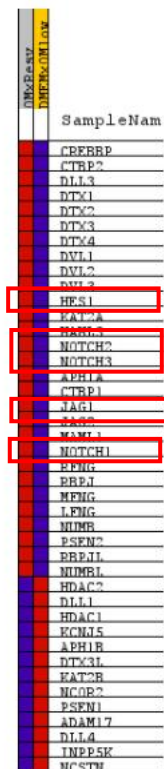


Figura 17 - Enriquecimento e classificação, tabela e *Heatmap* contendo os genes pertencentes a via de sinalização Notch, pelo banco de dados WikiPathways. Os resultados da análise WikiPathways mostraram que a via de sinalização Notch (B) foi enriquecida no grupo OM/RESV em relação ao OM. O painel superior indica as pontuações de enriquecimento (ES) de cada gene. O painel inferior mostra as métricas de classificação de cada gene. Eixo Y: classificação de valores métricos; Eixo X: classificações para todos os genes. Tabela (C) e o *Heatmap* (D) foram gerados pelo GSEA, utilizando-se o valor $\log_2\text{FoldChange}$ apresentado. Os retângulos mais alaranjados/vermelhos representam os genes mais expressos e os retângulos azuis representam os genes menos expressos.

5.8 Análises de expressão gênica

Para confirmação dos resultados apresentados no transcriptoma, as reações de PCR em tempo real foram realizadas para analisar os genes relacionados às vias de sinalização osteogênicas que se mostraram enriquecidas. Os genes avaliados foram: *GLI1*, *PTCH1*, *SMO* e *RAB23* da via de sinalização Hh e *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *JAG* e *HES1* da via de sinalização Notch.

As figuras a seguir representam os níveis relativos de RNAm dos genes avaliados na I-PDLCs, pela reação de PCR em tempo real, após pré-tratamento com Resveratrol por 3 dias, seguido de 10 dias de indução osteogênica *in vitro*, apresentados como média e desvio padrão. Para cada gene, foram realizados 3 experimentos independentes e cada amostra foi avaliada em triplicatas técnicas nas reações de PCR.

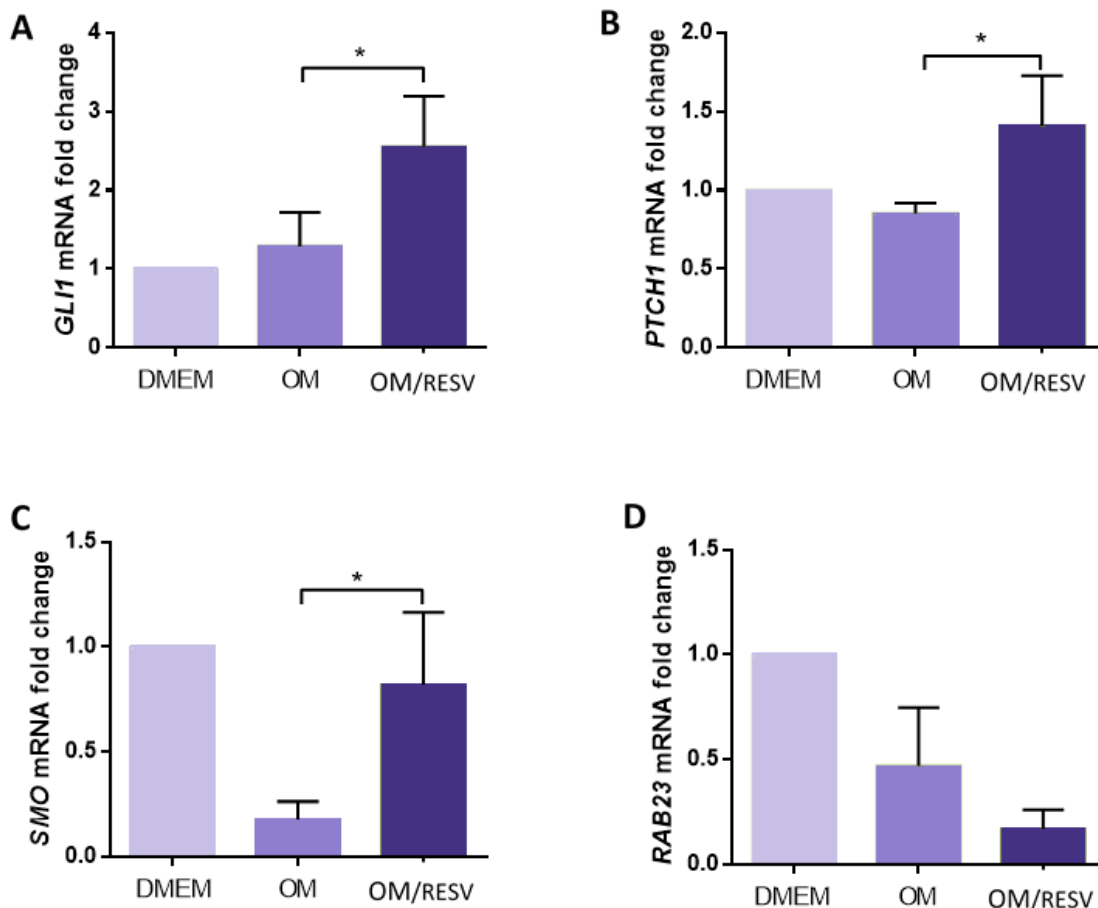


Figura 18 – Níveis de expressão de genes relacionados à via de sinalização Hedgehog.

A expressão relativa dos genes *GLI1* (A), *PTCH1* (B), *SMO* (C) e *RAB23* (D) foi analisada nos grupos controle (DMEM), no grupo apenas induzido à diferenciação osteogênica durante 10 dias (OM) e no grupo induzido à diferenciação osteogênica durante 10 dias, após o pré-tratamento com RESV a 0,1 μ M (OM/RESV) pelo método $\Delta\Delta CT$, com β -*ACTINA* e *18S* como genes de referência. * acima das barras representa diferença significativa entre

os grupos OM e OM/RESV ($p < 0,05$), pelo teste *T de student*. Foram realizados 3 experimentos independentes e cada amostra de cada grupo foi avaliada em triplicata técnica.

Houve aumento da expressão gênica de *GLI1*, *PTCH1* e *SMO* ($p \leq 0.05$) (Fig. 18 A-C) e diminuição dos transcritos do *RAB23*, embora sem diferença estatística (Fig. 18 D), nas I-PDLCs após pré-tratamento com Resveratrol (OM/RESV), comparando-se com o grupo OM.

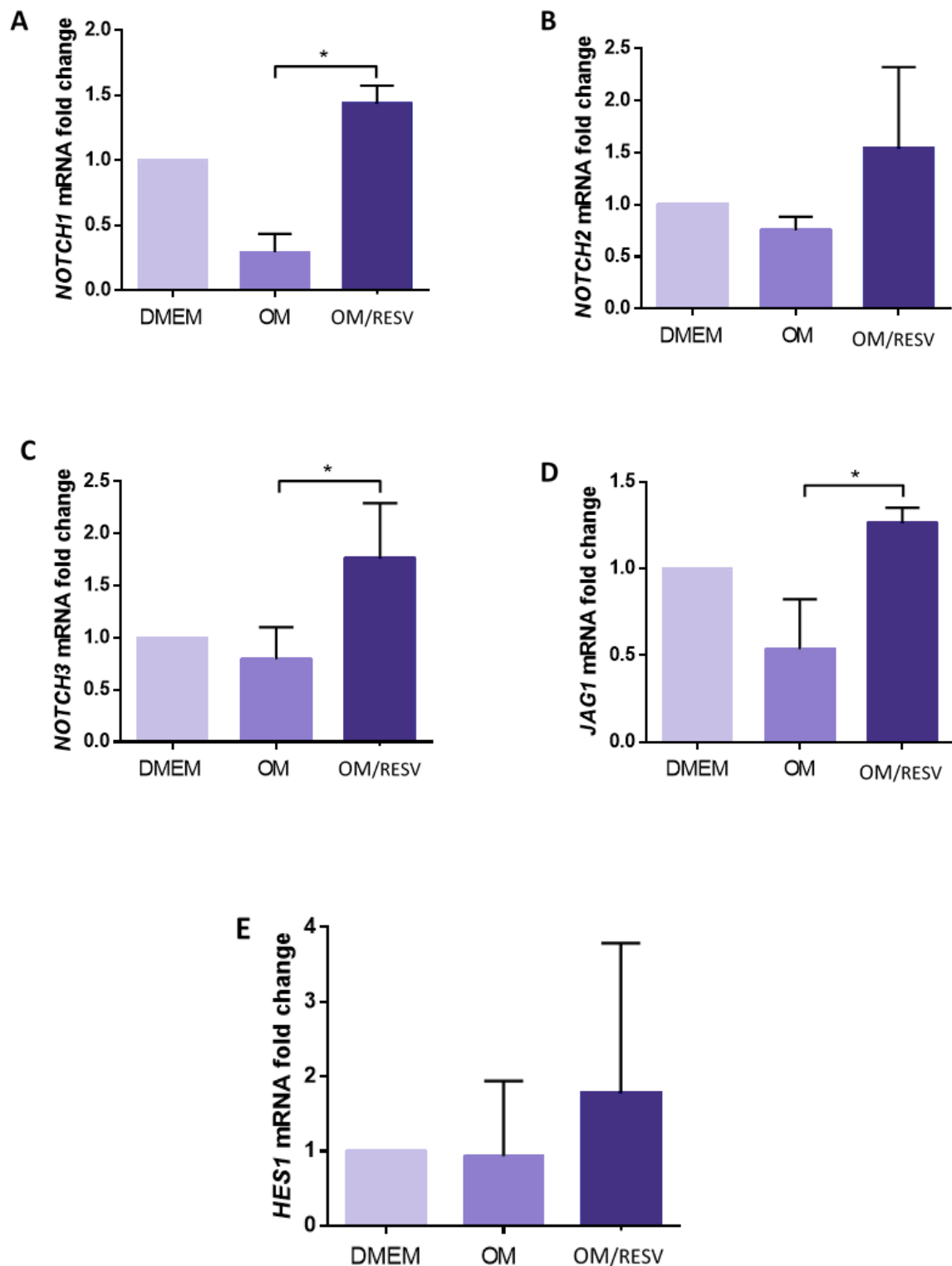


Figura 19 – Níveis de expressão gênica dos genes relacionados à via de sinalização Notch

A expressão relativa dos genes *NOTCH1* (A), *NOTCH2* (B), *NOTCH3* (C), *JAG1* (D) e *HES1* (E) foi analisada nos grupos controle (DMEM), no grupo apenas induzido à diferenciação osteogênica durante 10 dias (OM) e no grupo induzido à diferenciação osteogênica durante 10 dias, após o pré-tratamento com RESV a 0,1 μ M (OM/RESV) pelo método $\Delta\Delta$ CT, com β -*ACTINA* e *18S* como genes de referência. * acima das barras representa diferença significativa entre os grupos OM e OM/RESV ($p < 0,05$), pelo teste *T de student*. Foram realizados 3 experimentos independentes e cada amostra de cada grupo foi avaliada em triplicata técnica.

Houve aumento da expressão gênica de *NOTCH1*, *NOTCH3* e *JAG1* ($p \leq 0.05$) (Fig. 19 A, C, D), sem mudanças significativas para os genes *NOTCH2* e *HES1* (Fig. 19 B, E), embora pode-se observar uma tendência de aumento em alguns dos experimentos, principalmente para *NOTCH2*, nas I-PDLCs após pré-tratamento com Resveratrol (OM/RESV), comparando-se com o grupo OM.

Tabela 1 – Sequências de primers utilizados para qRT-PCR (humano)

Primer	Forward	Reversed
<i>GLI1</i>	CTTGTGGTCCCATGACTCT	GATTCAGGCTCACGCTTCTC
<i>PTCH1</i>	ATCCTCCCCGTCATTAGTGC	GTAACAAGGTGCTGGTGTGG
<i>SMO</i>	GGATGCAGACTCGGACTTCT	CTCTTTCCACAGTCCTGCT
<i>RAB23</i>	GCTAGAGCATCTCCCAGGTG	TCAGTGAGCAGCAAAAGGTG
<i>NOTCH1</i>	GGAAGTGTGAAGCGGCCAATG	ATAGTCTGCCACGCCTCTGC
<i>NOTCH2</i>	TGTCGAGATGGCTATGAACCCTG	GCAGCGGTTCTTCTCACAGG
<i>NOTCH3</i>	TGTCTGCCAGAGTTCAGTGGTG	AGGAGCAGAGGAAGCGTCCATC
<i>JAG1</i>	TGCCTCTGTGAGACCAACTG	GTTGGGTCCTGAATACCCCT
<i>HES1</i>	GTCATCCCCGTCTACACCAG	GAGGGAAGAGAGGTGGGTTG

6 DISCUSSÃO

As PDLCs são alvo de estudos envolvendo regeneração tecidual devido a sua ampla capacidade de diferenciação; entretanto, compreendem uma população heterogênea de células podendo apresentar desempenhos e resultados variáveis (Lindroos et al., 2008). Nesse sentido, com o intuito de melhorar a capacidade de diferenciação osteogênica, o tratamento com o Resveratrol representa uma alternativa às populações celulares que apresentam baixo potencial osteogênico. Composto natural e distribuído na natureza, o Resveratrol tem sido amplamente estudado devido a sua capacidade de promover a osteogênese e aliviar os efeitos da osteoporose. Apesar da grande quantidade de estudos fazendo essa associação, os mecanismos específicos pelos quais o Resveratrol age continuam desconhecidos (Yu T et al., 2020). Estudar os efeitos do Resveratrol em PDLCs com o objetivo de aumentar o potencial osteogênico dessas células e avaliar as diversas vias de sinalização associadas à osteogênese pode ajudar a elucidar os mecanismos de ação ativados por esse composto.

Nos experimentos de avaliação da capacidade de deposição de mineral após 21 dias de indução osteogênica, *in vitro*, realizados em duas populações de PDLCs (2 pacientes distintos), a heterogeneidade foi evidenciada, tanto em relação ao potencial osteogênico, quanto em relação ao potencial adipogênico, analisando a formação de vacúolos de lipídeos. Estas PDLCs foram, portanto, classificadas em alto potencial osteogênico (h-PDLCs) e baixo potencial osteogênico (l-PDLCs).

As l-PDLCs, foram submetidas à citometria de fluxo para a avaliação do estado de indiferenciação celular (fenotipagem) e apresentaram-se positivas (34,41%) para os marcadores de superfície CD105 e CD166, demonstrando assim a presença de células mesenquimais. O pré-tratamento com Resveratrol aumentou a quantidade de deposição de nódulos minerais nas l-PDLCs, demonstrando assim, a capacidade de resposta que essas células podem apresentar ao serem expostas a agentes osteoindutores, aumentando a diferenciação osteogênica.

A análise global dos genes diferencialmente expressos nas l-PDLCs, entre os grupos pré-tratado com Resveratrol ou apenas induzido à diferenciação osteogênica demonstrou o aumento significativo, no grupo pré-tratado com Resveratrol, da expressão do gene *GPSM1*, também conhecido como *AGS3*, da família de moduladores de proteínas G. Previamente, a

literatura já mostrou que este gene tem envolvimento com a diferenciação osteogênica de células mesenquimais indiferenciadas derivadas da polpa dental (Xing et al., 2015).

Em adição, o Resveratrol ativou a transcrição de diversos genes relacionados às vias osteogênicas. Por exemplo, o gene *TP53* (Tumor protein P53), que tem envolvimento com a remodelação óssea e também faz parte da via de sinalização osteogênica TGF- β (Hayrapetyan et al., 2015); o gene *JUN* (Jun Proto-Oncogene), que, juntamente com o gene *FOS*, forma a proteína ativadora-1 (*AP-1*), que é um fator de transcrição que se liga à região promotora de genes mecano-sensíveis, levando à regulação positiva de diversos fatores de crescimento envolvidos na diferenciação osteogênica, como o *IGF1* (Insulin Like Growth Factor 1) (Liedert et al., 2006). Além disso, genes como *DKK1* e *SOST*, tiveram suas expressões diminuídas no grupo pré-tratado com Resveratrol, sendo ambos reguladores negativos da via de sinalização osteogênica Wnt/ β -catenina (Hayrapetyan et al., 2015).

Em relação aos marcadores osteogênicos clássicos, foi possível observar aumento de expressão gênica no grupo OM/RESV para alkaline phosphatase (*ALPL*), osteocalcina (*BGLAP*), integrin binding sialoprotein (*IBSP*) e Sp7 Transcription Factor (*SP7*). A *ALPL*, marcador osteogênico amplamente utilizado como índice para avaliação da capacidade de formação óssea na osteoporose (Bolger, 1975; Garnero, 2008), já foi relacionada com uma doença de deformidade esquelética grave chamada hipofosfatasia, em casos de mutação gênica com perda de função proteica. Esta deformidade é caracterizada por perda de massa óssea e, consequentemente, fraturas patológicas (Liu et al., 2018). *BGLAP*, que também é um marcador osteogênico, é uma proteína produzida e secretada quase exclusivamente por osteoblastos (Manolagas, 2020). O enriquecimento de *BGLAP* e *ALPL*, em nossos resultados, corrobora com resultados da literatura, que demonstraram aumento de atividade e expressão de *BGLAP* e *ALPL*, após tratamento de PDLCs e MC3T3-E1 com Resveratrol (Min et al., 2020). O gene *IBSP* codifica uma proteína restrita ao tecido ósseo (Cremers et al., 2008), produzida por osteoblastos e por células tipo-osteoclastos em cultura celular e estimula a formação *in vitro* de hidroxapatita, mediando interações célula-célula. Ainda hoje não existem estudos demonstrando a influência do Resveratrol nesse gene. *SP7* é um gene codificante de um fator de transcrição osteoblasto-específico que ativa um repertório de genes durante a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros e osteócitos. O papel essencial desse gene na programação genética e na homeostase óssea é bem estabelecido: em

embriões com mutações nesse gene não ocorre a formação óssea nem a expressão de outros marcadores osteogênicos específicos (Sinha e Zhou, 2013). Em MSCs de humanos, o tratamento com Resveratrol aumentou significativamente a expressão de *SP7*, *RUNX2* e *BGLAP* (Dai et al., 2007). Além disso, Pino et al., em 2017 também associaram o tratamento com Resveratrol com aumento da expressão de *sp7* em defeitos em calvárias de ratos diabéticos. Dessa forma, podemos hipotetizar que o Resveratrol, ao ativar a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos citados acima, pode estar associado ao aumento de nódulos minerais, observado aos 21 dias de indução osteogênica *in vitro*.

Nas análises de enriquecimento através dos perfis funcionais (*Hallmarks*, *KEGG* e *WikiPathways*) realizadas pelo programa GSEA, podemos destacar as vias de sinalização osteogênicas Notch e Hh como as mais enriquecidas e positivamente moduladas no grupo OM/RESV. A via de sinalização Hh, altamente conservada, está envolvida no desenvolvimento embrionário, apresentando papel crítico no desenvolvimento e homeostase óssea (McKenzie et al., 2019; Haraguchi et al., 2019) e em nossos resultados, foi enriquecida após tratamento com Resveratrol. Destaque para os genes que codificam os ligantes Hedgehog: sonic (*SHH*), desert (*DHH*) e indian (*IHH*), a proteína transmembranar patch homólogo1 (*PTCH1*), que atua como receptor dos ligantes Hh para que se dê início à cascata de sinalização da via, e os fatores de transcrição da família GLI zinc finger: *GLI1*, *GLI2* e *GLI3*. Uma vez que algum dos ligantes Hh se liga ao receptor *PTCH1*, a molécula repressora *SMO* é liberada e a transcrição mediada através dos *GLI* é ativada, levando à regulação dos genes alvos da via Hh. Nos mamíferos, dentre os fatores de transcrição *Gli*, *GLI2* e *GLI3* são os primeiros a responder (Almam, 2015; Ryan e Chiang, 2012), sendo que *GLI1* é um mediador transcricional e um dos genes alvos diretos da via. *GLI2* é considerado predominantemente como um ativador transcricional da via, enquanto *GLI3* age principalmente como um repressor (Almam, 2015; Ryan e Chiang, 2012; Varjosalo e Taipale, 2008; Haraguchi et al., 2019). Pode-se também afirmar que o aumento da expressão de *PTCH1* seja um marcador da ativação da via de sinalização Hh (Agren et al., 2004; Chen et al., 2002).

Além do enriquecimento dos genes relacionados à via Hh, houve diminuição do enriquecimento do regulador negativo da via, o ras-associated binding protein 23 (*RAB23*). A proteína RAB23 localiza-se na membrana plasmática agindo em processos de tráfego de vesículas celulares, auxiliando moléculas e componentes celulares a se movimentarem entre

os diversos compartimentos celulares (Evans et al., 2003). Está relacionada à regulação negativa de *GLI1* (Evans et al., 2003), sendo upstream a *GLI2*, exercendo seu papel durante a produção do repressor *GLI3*, o qual diminuiu 5 vezes quando processado proteoliticamente em extratos de embriões com mutação de *RAB23*, em comparação aos animais *wildtype*. Sendo assim, nossos resultados estão de acordo com os dados apresentados na literatura uma vez que a diminuição do enriquecimento do regulador negativo *RAB23* se deu concomitantemente ao enriquecimento dos genes *GLI1*, *GLI2* e *GLI3*, sugerindo que houve a ativação da via Hh após o pré-tratamento com Resveratrol.

Além disso, a relação entre *IHH*, *BGLAP* e *ALPL* está descrita na literatura, pois o aumento de expressão de *IHH* intensificou a atividade de *ALPL* e os níveis de expressão de *BGLAP* (Shimoyama et al., 2007; Zou et al., 2014; Deng et al., 2017). Dessa forma, pode-se relacionar o aumento de expressão dos genes *IHH*, *BGLAP* e *ALPL* com o aumento da deposição mineral aos 21 dias *in vitro*.

Nesse sentido, baseando-se nos resultados de enriquecimento tanto do receptor *PTCH1*, quanto dos ligantes *IHH*, *DHH* e *IHH* e dos genes alvos *GLI1* e *GLI2*, sugerimos que o Resveratrol promoveu uma ativação da via Hh, aos 10 dias de indução osteogênica *in vitro*, o que pode ter contribuído para o aumento da deposição de nódulos minerais e, consequentemente, aumento de potencial osteogênico das I-PDLCs, aos 21 dias de indução osteogênica. Vale ressaltar que ainda não há estudos científicos que demonstrem o impacto transcricional do Resveratrol na via Hh, com efeitos osteogênicos positivos, em PDLCs.

A via Notch também apresentou maior enriquecimento em diversos genes no grupo OM/RESV. Dentre eles, os genes que codificam os ligantes Jagged Canonical Notch Ligand 1 (*JAG1*), delta like canonical notch ligand 3 (*DLL3*), os receptores notch (*NOTCH1*, *NOTCH2* e *NOTCH3*) e o fator de transcrição Hes Family BHLH Transcription Factor 1 (*HES1*). A via Notch é uma via onipresente, altamente conservada e representa um sistema que regula a proliferação celular, o comprometimento e função celular e exerce papel importante no desenvolvimento e regeneração esquelética e homeostase. Sérias desordens esqueléticas, como a osteoartrite e o osteosarcoma, podem ser atribuídas a desregulações nessa via (Zanotti e Canalis, 2010; Luo et al., 2019).

Em cultura celular, Luo et al., em 2019 observaram aumento significativo na formação de nódulos calcificados quando o domínio citoplasmático de NOTCH1 foi entregue por um vetor adenovírus em células osteoblásticas MC3T3-E1. Consistente com esses achados, eles mostraram que a mineralização primária do osteoblasto mediada pelo ligante *JAG1* foi aumentada. Efeito similar foi observado por Ugarte et al., 2009, quando houve um aumento de mineralização através da transfecção por vetores lentivirais contendo *NOTCH1* ou *JAG1* em células humanas da medula óssea (BMSCs). Em células osteoblásticas em modelo animal, ratos superexpressando notch1 foram diagnosticados com esclerose óssea severa devido à alta proliferação de osteoblastos imaturos (Engin et al., 2008). Quanto ao fator de transcrição *HES1*, sua função é controversa pois, ao mesmo tempo que há evidências associando sua ação à inibição do gene *RUNX2* (Hilton et al., 2008), também há estudos demonstrando que o aumento da sua expressão em fases iniciais da diferenciação osteogênica, estaria relacionado ao aumento da expressão proteica de RUNX2 em células MC3T3-1 (Suh et al., 2008).

Na literatura há apenas um estudo envolvendo o tratamento com Resveratrol e a ativação da via de sinalização Notch (Ji et al., 2017). Entretanto, ainda não há associação direta da ativação da via Notch pelo Resveratrol em relação à modulação da osteogênese, em PDLCs.

As análises de expressão gênica por PCR em tempo real de genes das vias Hh e Notch confirmaram os resultados encontrados no Transcriptoma, mais especificamente, para os transcritos gênicos de *GLI1*, *PTCH1*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH3* e *JAG1* e redução do *RAB23*.

7 CONCLUSÃO

O Resveratrol aumentou o potencial osteogênico das células com baixo potencial osteogênico e promoveu mudanças em genes das vias de sinalização osteogênicas Hedgehog e Notch. Genes marcadores de outras vias osteogênicas, como *ALPL*, *BLGLAP*, *IBSP* e *SP7* também foram modulados e tiveram sua expressão aumentada. Este enriquecimento pode estar relacionado ao aumento da deposição mineral e, portanto, do potencial osteogênico observado *in vitro*, em PDLCs com baixo potencial osteogênico.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of Resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5A):2783-840.
- Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene.* 2004 Apr 14;330:101-14. doi: 10.1016/j.gene.2004.01.010.
- Ai T, Zhang J, Wang X, Zheng X, Qin X, Zhang Q, Li W, Hu W, Lin J, Chen F. DNA methylation profile is associated with the osteogenic potential of three distinct human odontogenic stem cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2018 Jan 12;3:1. doi: 10.1038/s41392-017-0001-6.
- Alman BA. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Sep;11(9):552-60. doi: 10.1038/nrrheum.2015.84.
- Aravamudhan A, Ramos DM, Nip J, Subramanian A, James R, Harmon MD, Yu X, Kumbar SG. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering. *Curr Pharm Des.* 2013;19(19):3420-8. doi: 10.2174/1381612811319190008.
- Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TR, Murphy MJ, Nolte JA, Pittenger M, Stojkovic M. Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells.* 2012 Jan;30(1):2-9. doi: 10.1002/stem.1007.
- Assis RIF, Schmidt AG, Racca F, da Silva Ra, Zambuzzi WF, Silvério KG, Nociti Júnior FH, Pecorari VG, Wiench M, Andia DC. DNMT1 inhibitor restores RUNX2 expression and mineralization in periodontal ligament cells. *DNA and Cell Biology*, 2021.
- Bates, P., & Ramachandran, M. (2007). Chapter 14: Bone injury, healing and grafting. *Basic Orthopaedic Sciences*. London: Hodder Arnold; 2007:123-134.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Feb;(371):10-27
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jun;5(6):493-506. doi: 10.1038/nrd2060.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963. 197:452-454. *J Immunol*. 2014 Jun 1;192(11):4945-7

Bhat KPL, Kosmeder JW 2nd and Pezzuto JM: Biological effects of Resveratrol. *Antioxid Redox Signal* 3: 1041-1064, 2001.

Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, Lee JC. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomater*. 2016 Jan;29:398-408. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.031.

Blighe K, Rana S, Lewis M. EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.4.0. 2019. Available from: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.

Bolger JT. Heterotopic bone formation and alkaline phosphatase. *Arch Phys Med Rehabil*. 1975 Jan;56(1):36-9.

Botelho, J., Cavacas, M. A., Machado, V., & Mendes, J. J. (2017, November 17). Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1347705>

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Becker R. Bone biology, part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371–386

Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jul;43(7):900-6. doi: 10.1016/j.ijom.2014.01.009.

Chan MM. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol*. 2002 Jan 15;63(2):99-104. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00886-3.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev*. 2002 Nov 1;16(21):2743-8. doi: 10.1101/gad.1025302.

Chen XH, Shi ZG, Lin HB, Wu F, Zheng F, Wu CF, Huang MW. Resveratrol alleviates osteoporosis through improving the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Jul;23(14):6352-6359. doi: 10.26355/eurrev_201907_18459.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002 Mar;17(3):513-20. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513

Creasy LL and Coffee M: Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hort Sci* 113: 230-234, 1988.

Cremers S, Garnero P, Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Principles of Bone Biology.* 2008; 87: 1857-1881. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00020-3>.

Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 2011 Jan;22(1):1-20. doi: 10.1007/s00198-010-1272-8.

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013 Oct;34(5):658-90. doi: 10.1210/er.2012-1026.

Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 27;103(26):9912-7. doi: 10.1073/pnas.0603824103

Dapeng L, Xiaojie L, Ping G, Yan D, Gang S. Erk1/2 signalling is involved in the differentiation of periodontal ligament stem cells to Schwann cells in dog. *Arch Oral Biol.* 2014 May;59(5):487-91. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.010.

Daroch F, Hoeneisen M, González CL, Kawaguchi F, Salgado F, Solar H, García A. In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios.* 2001;104(408):79-85.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011 May 31;9:66. doi: 10.1186/1741-7015-9-66.

Docherty JJ, Fu MM, Stiffler BS, Limperos RJ, Pokabla CM, DeLucia AL. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 1999 Oct;43(3):145-55. doi: 10.1016/s0166-3542(99)00042-x.

Docherty JJ, Smith JS, Fu MM, Stoner T, Booth T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res.* 2004 Jan;61(1):19-26. doi: 10.1016/j.antiviral.2003.07.001.

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*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905

Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*. 2006 Jan;86(1):77-91. doi: 10.1093/ptj/86.1.77.

Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Feb;(371):38-45. doi: 10.1097/00003086-200002000-00005

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21. doi: 10.1097/00003086-199810001-00003.

Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):299-305. doi: 10.1038/nm1712.

Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*. 2011 Jun;22(6):2003-6. doi: 10.1007/s00198-011-1611-4.

Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, Wang BB, Huang GT, Wang S, Shi S. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):20-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01593.x.

Feng YL, Jiang XT, Ma FF, Han J, Tang XL. Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity. *Int J Mol Med*. 2018 Jan;41(1):202-212. doi: 10.3892/ijmm.2017.3208.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi:10.1155/2015/421746

Franck FC, Benatti BB, Andia DC, Cirano FR, Casarin RC, Corrêa MG, Ribeiro FV. Impact of Resveratrol on bone repair in rats exposed to cigarette smoke inhalation: histomorphometric and bone-related gene expression analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Apr;47(4):541-548. doi: 10.1016/j.ijom.2017.08.004.

Franck, F. C., Benatti, B. B., Andia, D. C., Cirano, F. R., Casarin, R. C., Corrêa, M. G., & Ribeiro, F. V. (2018). Impact of Resveratrol on bone repair in rats exposed to cigarette smoke inhalation: histomorphometric and bone-related gene expression analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47(4), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.08.004>

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968 Mar;6(2):230-47.

Gao LN, An Y, Lei M, Li B, Yang H, Lu H, Chen FM, Jin Y. The effect of the coumarin-like derivative osthole on the osteogenic properties of human periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(38):9937-51. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.017.

Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mol Diagn Ther*. 2008;12(3):157-70. doi: 10.1007/BF03256280.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797

Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016 Sep 15;32(18):2847-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313

Haraguchi R, Kitazawa R, Kohara Y, Ikeda A, Imai Y, Kitazawa S. Recent Insights into Long Bone Development: Central Role of Hedgehog Signaling Pathway in Regulating Growth Plate. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 20;20(23):5840. doi: 10.3390/ijms20235840.

Hayrapetyan A, Jansen JA, van den Beucken JJ. Signaling pathways involved in osteogenesis and their application for bone regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Feb;21(1):75-87. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0119

Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*. 2015 May 22;16(1):169. doi: 10.1186/s12859-015-0611-3

Heredia A, Davis C, Redfield R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000 Nov 1;25(3):246-55. doi: 10.1097/00126334-200011010-00006.

Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):549-55. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00102-4

Hynes M, Stone DM, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron*. 1997 Jul;19(1):15-26. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80344-x

Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014.

Ji Y, Ke Y, Gao S. Intermittent activation of notch signaling promotes bone formation. *Am J Transl Res*. 2017 Jun 15;9(6):2933-2944

Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:167-75

Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration - intrabony defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2 Suppl):S77-104. doi: 10.1902/jop.2015.130685.

Karlstrom RO, Tyurina OV, Kawakami A, Nishioka N, Talbot WS, Sasaki H, Schier AF. Genetic analysis of zebrafish gli1 and gli2 reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development*. 2003 Apr;130(8):1549-64. doi: 10.1242/dev.00364.

Kebschull M, Hülsmann C, Hoffmann P, Papapanou PN. Genome-Wide Analysis of Periodontal and Peri-Implant Cells and Tissues. *Methods Mol Biol*. 2017;1537:307-326. doi: 10.1007/978-1-4939-6685-1_18.

Kolkesen Şahin Ö, Çina Aksoy M, Avunduk MC. Effects of Resveratrol and cigarette smoking on bone healing: histomorphometric evaluation. *Turk J Med Sci*. 2016 Jun 23;46(4):1203-8. doi: 10.3906/sag-1501-109.

Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol*. 1998 Jun;138(6):619-20. doi: 10.1530/eje.0.1380619

L. G. Raisz and G. A. Rodan, "Embryology and cellular biology of bone," in *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*, L.V. Avioli and S. M. Krane, Eds., pp. 1–22, Academic Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 1998.

Lameira AG Jr, Franoso BG, Absy S, Pecorari VG, Casati MZ, Ribeiro FV, Andia DC. Resveratrol Reverts Epigenetic and Transcription Changes Caused by Smoke Inhalation on Bone-Related Genes in Rats. *DNA Cell Biol.* 2018 Aug;37(8):670-679. doi: 10.1089/dna.2018.4237.

Langcake P and McCarthy W: The relationship of Resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18: 244-253, 1979.

Langcake P and Pryce RJ: The production of Resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 9: 77-86, 1976.

Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development.* 1997 Jul;124(13):2537-52.

Lee SK, Mbwapbo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Mehta RG, Kinghorn AD and Pezzuto JM: Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen* 1: 35-46, 1998

Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 13;349(1):1-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.214.

Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Apr 4;368(2):329-35. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.081.

Liu L, Walker EA, Kissane S, Khan I, Murray PI, Rauz S, Wallace GR. Gene expression and miR profiles of human corneal fibroblasts in response to dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Sep 21;52(10):7282-8. doi: 10.1167/iovs.11-7463.

Liu, W., Zhang, L., Xuan, K. *et al.* *Alpl* prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res* 6, 27 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0029-4>

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, Kevil CG, Dong Y. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *Am J Pathol*. 2019 Aug;189(8):1495-1500. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.05.005.

Lv YJ, Yang Y, Sui BD, Hu CH, Zhao P, Liao L, Chen J, Zhang LQ, Yang TT, Zhang SF, Jin Y. Resveratrol counteracts bone loss via mitofilin-mediated osteogenic improvement of mesenchymal stem cells in senescence-accelerated mice. *Theranostics*. 2018 Mar 23;8(9):2387-2406. doi: 10.7150/thno.23620.

Mahady GB, Pendland SL, Chadwick LR. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol*. 2003 Jun;98(6):1440-1. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07513.x.

Mahady GB, Pendland SL. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol*. 2000 Jul;95(7):1849. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.02146.x

Majidinia, M., Sadeghpour, A., & Yousefi, B. (2018, April 1). The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.26042>

Manolagas SC. Osteocalcin promotes bone mineralization but is not a hormone. *PLoS Genet*. 2020 Jun 2;16(6):e1008714. doi: 10.1371/journal.pgen.1008714.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001 Oct;86(10):1099-100.

Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988 Sep;183(1):1-44. doi: 10.1002/aja.1001830102.

Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(11):1135-1148. doi:10.1002/sctm.19-0044

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):201-9. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027

McKenzie JA, Maschhoff C, Liu X, Migotsky N, Silva MJ, Gardner MJ. Activation of hedgehog signaling by systemic agonist improves fracture healing in aged mice. *J Orthop Res*. 2019 Jan;37(1):51-59. doi: 10.1002/jor.24017.

Min KK, Neupane S, Adhikari N, Sohn WJ, An SY, Kim JY, An CH, Lee Y, Kim YG, Park JW, Lee JM, Kim JY, Suh JY. Effects of resveratrol on bone-healing capacity in the mouse tooth extraction socket. *J Periodontal Res.* 2020 Apr;55(2):247-257. doi: 10.1111/jre.12710.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12. doi: 10.1073/pnas.0937635100.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Jan;109(1):199-209; discussion 210-1. doi: 10.1097/00006534-200201000-00030.

Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Dec 30;253(3):859-63. doi: 10.1006/bbrc.1998.9870

Mobasheri A, Shakibaei M. Osteogenic effects of Resveratrol in vitro: potential for the prevention and treatment of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Jul;1290:59-66. doi: 10.1111/nyas.12145.

Moon DK, Kim BG, Lee AR, In Choe Y, Khan I, Moon KM, Jeon RH, Byun JH, Hwang SC, Woo DK. Resveratrol can enhance osteogenic differentiation and mitochondrial biogenesis from human periosteum-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res.* 2020 Jun 3;15(1):203. doi: 10.1186/s13018-020-01684-9

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003 Jul;34(3):267-73. doi: 10.1038/ng1180.

Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Xu X, Chee WW, Schricker SR, Shi S. Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Nov;101(11):3285-94. doi: 10.1002/jbm.a.34546.

Moshaverinia A, Xu X, Chen C, Ansari S, Zadeh HH, Snead ML, Shi S. Application of stem cells derived from the periodontal ligament or gingival tissue sources for tendon tissue regeneration. *Biomaterials.* 2014 Mar;35(9):2642-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.053.

Moshiri, A., & Oryan, A. (2012). Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: Current concepts, approaches and concerns. *Hard Tissue*, 1(2), 11. Mountziaris

Ng TK, Yung JS, Choy KW, Cao D, Leung CK, Cheung HS, Pang CP. Transdifferentiation of periodontal ligament-derived stem cells into retinal ganglion-like cells and its microRNA signature. *Sci Rep*. 2015 Nov 9;5:16429. doi: 10.1038/srep16429.

Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H. Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. *Cell Transplant*. 2014 Apr;23(6):691-701. doi: 10.3727/096368913X663587.

Novelle MG, Wahl D, Diéguez C, Bernier M, de Cabo R. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev*. 2015 May;21:1-15. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.002.

Ornstrup MJ, Harsløf T, Kjær TN, Langdahl BL, Pedersen SB. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Dec;99(12):4720-9. doi: 10.1210/jc.2014-2799.

Pan A, Chang L, Nguyen A, James AW. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. *Front Physiol*. 2013 Apr 2;4:61. doi: 10.3389/fphys.2013.00061.

Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017 Apr;14(4):417-419. doi: 10.1038/nmeth.4197.

Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol*. 1999 Dec 15;68(1-3):71-6. doi: 10.1016/s0378-8741(99)00044-6.

Pelaez D, Acosta Torres Z, Ng TK, Choy KW, Pang CP, Cheung HS. Cardiomyogenesis of periodontal ligament-derived stem cells by dynamic tensile strain. *Cell Tissue Res*. 2017 Feb;367(2):229-241. doi: 10.1007/s00441-016-2503-x.

Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol*. 2004 Oct;19(4):1325-44. doi: 10.14670/HH-19.1325.

Powers RK, Goodspeed A, Pielke-Lombardo H, Tan AC, Costello JC. GSEA-InContext: identifying novel and common patterns in expression experiments. *Bioinformatics*. 2018 Jul 1;34(13):i555-i564. doi: 10.1093/bioinformatics/bty27

Qi W, Schlapbach R, Rehrauer H. RNA-Seq Data Analysis: From Raw Data Quality Control to Differential Expression Analysis. *Methods Mol Biol*. 2017;1669:295-307. doi: 10.1007/978-1-4939-7286-9_23.

Raut N, Wicks SM, Lawal TO, Mahady GB. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacol Res*. 2019 Sep;147:104350. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104350.

Ribeiro FV, Pino DS, Franck FC, Benatti BB, Tenenbaum H, Davies JE, Pimentel SP, Casarin RC, Cirano FR, Casati MZ. Resveratrol Inhibits Periodontitis-Related Bone Loss in Rats Subjected to Cigarette Smoke Inhalation. *J Periodontol*. 2017 Aug;88(8):788-798. doi: 10.1902/jop.2017.170025

Ryan KE, Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem*. 2012 May 25;287(22):17905-13. doi: 10.1074/jbc.R112.356006.

S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012 Apr 30;5:19. doi: 10.1186/1756-8722-5-19.

S. Khosla, M.J. Oursler, and D. G. Monroe, "Estrogen and the skeleton," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, no. 11, pp. 576–581, 2012.

Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int*. 2014;2014:404680. doi: 10.1155/2014/404680.

Saito MT, Salmon CR, Amorim BR, Ambrosano GM, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG. Characterization of highly osteoblast/cementoblast cell clones from a CD105-enriched periodontal ligament progenitor cell population. *J Periodontol*. 2014 Jun;85(6):e205-11. doi: 10.1902/jop.2014.130461.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.

Shalini HS, Vandana KL. Direct application of autologous periodontal ligament stem cell niche in treatment of periodontal osseous defects: A randomized controlled trial. *J Indian Soc Periodontol*. 2018 Nov-Dec;22(6):503-512. doi: 10.4103/jisp.jisp_92_18.

Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010 Aug;81(8):1207-15. doi: 10.1902/jop.2010.090729.

Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):444-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.016.

Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem*. 2013 May;114(5):975-84. doi: 10.1002/jcb.24439.

Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Sep;9(9):522-36. doi: 10.1038/nrendo.2013.137.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006 Dec 20;1(1):e79. doi: 10.1371/journal.pone.0000079.

Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yen ML. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19385-98. doi: 10.1074/jbc.M702452200.

Suaid FF, Ribeiro FV, E Silva Gomes TRL, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH Jr., Casati MZ, Sallum EA. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class III furcation defects: a study in dogs. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 377–384. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01858.x.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.[

Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 15;32(4):314-8. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00803-6.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. 2011;6(7):e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800.

Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *J Periodontol*. 2005;76(3):468-475. doi:10.1902/jop.2005.76.3.468

Takaoka MJ: J Faculty Sci Hokkaido Imperial U 3: 1-16, 1940.

Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S, Motoike S, Komatsu N, Matsuda S, Ouhara K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration. *J Dent Res*. 2017 Aug;96(9):984-991. doi: 10.1177/0022034517708770.

Tassi SA, Sergio NZ, Misawa MYO, Villar CC. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies. *J Periodontal Res*. 2017 Oct;52(5):793-812. doi: 10.1111/jre.12455.

Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):917-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.031.

Ting Zhou, Yurong Yan, Chenchen Zhao, Yao Xu, Qiong Wang & Na Xu (2019) Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production via AMPK activation, *Redox Report*, 24:1, 62-69, doi: 10.1080/13510002.2019.1658376

Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells Dev*. 2019 Aug 1;28(15):974-985. doi: 10.1089/scd.2019.0031

Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, Peng HW, Hsieh CF, Kuo ML, Yen ML. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res*. 2011 Oct;26(10):2552-63. doi: 10.1002/jbmr.460.

Ugarte F, Ryser M, Thieme S, Fierro FA, Navratil K, Bornhäuser M, Brenner S. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2009 Jul;37(7):867-875.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2009.03.007.

Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008 Sep 15;22(18):2454-72. doi: 10.1101/gad.1693608.

Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem*. 2000 Feb;48(2):253-6. doi: 10.1021/jf9909196.

Vettore MV, Marques RA, Peres MA. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível [Social inequalities and periodontal disease: multilevel approach in SBBrazil 2010 survey]. *Rev Saude Publica*. 2013;47 Suppl 3:29-39. doi:10.1590/s0034-8910.2013047004422

Walmsley GG, Ransom RC, Zielins ER, Leavitt T, Flacco JS, Hu MS, Lee AS, Longaker MT, Wan DC. Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Rev Rep*. 2016 Oct;12(5):524-529. doi: 10.1007/s12015-016-9665-5

Wang T, Kang W, Du L, Ge S. Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Mol Med*. 2017 Nov;21(11):3100-3112. doi: 10.1111/jcmm.13222.

Wang X, Chen L, Peng W. Protective effects of Resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- κ B signaling pathway in rats. *Exp Ther Med*. 2017 Nov;14(5):5032-5038. doi: 10.3892/etm.2017.5147.

Wang X, Chen L, Peng W. Protective effects of Resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- κ B signaling pathway in rats. *Exp Ther Med*. 2017 Nov;14(5):5032-5038. doi: 10.3892/etm.2017.5147.

Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop*. 2013 Dec;37(12):2491-8. doi: 10.1007/s00264-013-2059-2.

Wang Y, Azaïs T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, Pehau-Arnaudet G, Babonneau F, Giraud-Guille MM, Nassif N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater*. 2012 Jul 1;11(8):724-33. doi: 10.1038/nmat3362.

Wang YJ, Zhao P, Sui BD, Liu N, Hu CH, Chen J, Zheng CX, Liu AQ, Xuan K, Pan YP, Jin Y. Resveratrol enhances the functionality and improves the regeneration of mesenchymal stem cell aggregates. *Exp Mol Med*. 2018 Jun 27;50(6):1-15. doi: 10.1038/s12276-018-0109-y.

Xing J, Lian M, Shen Q, Feng G, Huang D, Lu X, Gu Z, Li L, Zhang J, Huang S, You Q, Wu X, Zhang D, Feng X. AGS3 is involved in TNF- α mediated osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Differentiation*. 2015 Jun;89(5):128-36. doi: 10.1016/j.diff.2015.06.001

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr;18(3):487-96. doi: 10.1089/scd.2008.0113

Yang X, Jiang T, Wang Y, Guo L. The Role and Mechanism of SIRT1 in Resveratrol-regulated Osteoblast Autophagy in Osteoporosis Rats. *Sci Rep*. 2019 Dec 5;9(1):18424. doi: 10.1038/s41598-019-44766-3.

Yu T, Wang Z, You X, Zhou H, He W, Li B, Xia J, Zhu H, Zhao Y, Yu G, Xiong Y, Yang Y. Resveratrol promotes osteogenesis and alleviates osteoporosis by inhibiting p53. *Aging (Albany NY)*. 2020 May 27;12(11):10359-10369. doi: 10.18632/aging.103262.

Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol*. 2010 Feb;30(4):886-96. doi: 10.1128/MCB.01285-09

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787-98. doi: 10.4049/jimmunol.0902318. Erratum in: *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1656

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787-98. doi: 10.4049/jimmunol.0902318. Erratum in: *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1656.

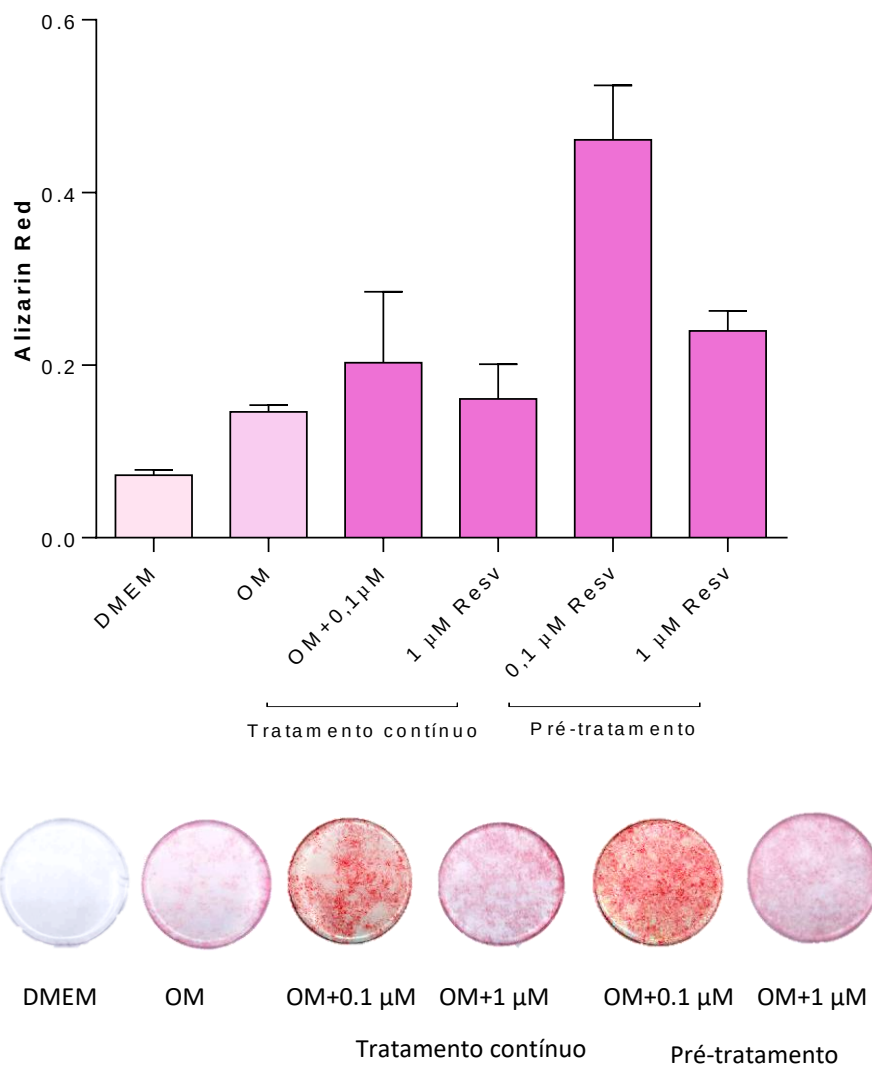
Zhao XE, Yang Z, Zhang H, Yao G, Liu J, Wei Q, Ma B. Resveratrol Promotes Osteogenic Differentiation of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway. *Cell Reprogram*. 2018 Dec;20(6):371-381. doi: 10.1089/cell.2018.0032.

Zhou T, Yan Y, Zhao C, Xu Y, Wang Q, Xu N. Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production *via* AMPK activation. *Redox Rep*. 2019 Dec;24(1):62-69. doi: 10.1080/13510002.2019.1658376.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859.

ANEXOS

ANEXO 1 - AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E TRATAMENTOS COM RESVERATROL



Anexo 1 – Avaliação das concentrações e tratamentos com Resveratrol

As concentrações de 0,1 μ M e 1 μ M foram testadas e avaliadas através do ensaio de coloração por Alizarina Red. O tratamento ou pré-tratamento das células também foi avaliado em ambas as concentrações.

ANEXO 2 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE VIAS OSTEOGÊNICAS EM CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE HUMANOS TRATADAS COM RESVERATROL

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

14%	11%	9%	2%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	3%
2	hdl.handle.net Fonte da Internet	1%
3	repositorio.ufsc.br Fonte da Internet	1%
4	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	1%
5	teses.usp.br Fonte da Internet	<1%
6	Natalia Garcia. "Inibidores da via de sinalização do Sonic hedgehog: avaliação de seus efeitos in vitro em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2020 Publicação	<1%

ANEXO 3 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Regulação epigenética em células mesenquimais humanas", protocolo CAAE nº 55588816.4.0000.5418, dos pesquisadores Denise Carleto Andia, Rahyza Inacio Freire de Assis e Francesca Racca, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02 de outubro de 2017.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "Epigenetic regulation in human mesenchymal stem cells", CAAE 55588816.4.0000.5418, of Denise Carleto Andia, Rahyza Inacio Freire de Assis and Francesca Racca, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on October 02, 2017.

Profa. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparece como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.