

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO COM DIFERENTES
POTENCIAIS OSTEOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ROGÉRIO SALINAS FERREIRA

**SÃO PAULO
2020**

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO COM DIFERENTES
POTENCIAIS OSTEOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia.

ROGÉRIO SALINAS FERREIRA

**SÃO PAULO
2020**

Ferreira, Rogério Salinas.

Análise transcricional de células do ligamento periodontal humano com diferentes potenciais osteogênicos / Rogério Salinas Ferreira. - 2020.
19 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Periodontia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia.

1. Transcriptoma. 2. Célula-tronco. 3. Periodontal. 4. Osteogênese.
I. Andia, Denise Carleto Andia (orientadora). II. Título.

ROGÉRIO SALINAS FERREIRA

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO COM DIFERENTES
POTENCIAIS OSTEOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

_____ - ___/___/___

Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ___/___/___

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ___/___/___

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade de Taubaté - UNITAU

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônia de Lourdes Salinas Ferreira e José Djalma Ferreira (*in memoriam*), à minha esposa, Mônica Venturineli Ferreira, e à minha filha, Gabriela Venturineli Ferreira, que são meus exemplos e fonte de força e inspiração em minha jornada na pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Senhor JESUS CRISTO, pela dádiva da vida, pelo sustento e fortalecimento durante toda essa caminhada e por seu amor incondicional.

Às três mulheres da minha vida: minha mãe, minha esposa e minha filha, pelo apoio constante para que eu pudesse seguir na busca por este sonho, por acreditarem no meu potencial; pelas palavras de motivação nos momentos de desânimo e principalmente por terem sacrificado momentos de lazer e descanso para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

Aos meus familiares, especialmente ao meu irmão Tiago Salinas Ferreira, por sempre torcer pelas minhas conquistas, mesmo que fisicamente distante.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia, por ter me introduzido e guiado num assunto, até então, totalmente desconhecido para mim, por toda paciência e dedicação durante esse meu aprendizado, pela confiança no meu trabalho, por ter sido muito mais do que um exemplo de excelência acadêmica, mas um exemplo de ser humano generoso e motivador.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UNIP, especialmente a Prof.^a Dr.^a Cintia Saraceni, Prof.^a Dr.^a Vanessa Pecorari, Prof.^a Dr.^a Flávia Rodrigues, Prof.^a Sônia Ribeiro, Prof. Dr. Mendel Abramowicz, Prof. Dr. Alfredo Mikail, Prof. Dr. Luciano Dib e Prof. Dr. Adriano Lima, por toda ajuda, toda atenção e todos os conselhos dados durante essa jornada e por compartilharem não apenas seus conhecimentos, mas também suas experiências e vivências, graças aos quais posso ser hoje uma pessoa melhor.

Aos meus amigos de pós-graduação, especialmente a Tayná Castro, Nathalia Prado, Nadya Bellandi, Ariane Ali e Eduardo Colella, pela parceria sempre acompanhada de um cafezinho, tornando os dias mais leves e alegres, pelas conversas descontraídas, mas sempre construtivas e pelas palavras e ações de apoio.

A nossa equipe de projeto e pesquisa, Dr. Arthur Schmidt, Dra. Beatriz Ganhito, Dra. Francesca Racca e especialmente a Dra. Rahyza Freire, por toda a análise dos dados de bioinformática deste trabalho.

Aos funcionários da UNIP, em especial, à Juliana Ratcow, Daniele Mota, Vera Maia, Andressa Nickel e ao “James”, por toda gentileza e ajuda nas tarefas diárias.

À UNIP – Universidade Paulista, pelo apoio e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pelo auxílio financeiro para a minha bolsa de Mestrado.

“Sabedoria é o uso correto do conhecimento”

(Charles H. Spurgeon)

RESUMO

O metabolismo ósseo é um dos principais influenciadores no desenvolvimento de novas técnicas e abordagens tanto na Medicina quanto na Odontologia. A compreensão de seus mecanismos moleculares é fundamental para o sucesso dos tratamentos clínicos. Muitas pesquisas têm demonstrado o potencial das células mesenquimais indiferenciadas (*mesenchymal stem cells* – MSCs) na reparação e preservação tecidual, por apresentarem capacidade de autorrenovação e diferenciação em multilinhagem celular. Na cavidade oral, as PDLSCs (*periodontal ligament stem cells*) podem ser encontradas no ligamento periodontal e possuem potencial de diferenciação osteogênica. Entretanto, antes que essas células possam servir aos seus propósitos em aplicações clínicas, mais pesquisas são necessárias para entender os mecanismos envolvidos em seu potencial osteogênico. Nesse intuito, esta pesquisa tem por objetivo identificar as possíveis causas da heterogeneidade dos potenciais osteogênicos entre as PDLSCs por meio da análise e comparação do perfil transcricional de PDLSCs com diferentes potenciais osteogênicos (alto e baixo) — em níveis basais e também após indução osteogênica *in vitro* por 10 dias — processo que será executado a partir de transcriptoma (ou RNA-Seq), que consiste na análise do conjunto de todos os transcritos expressos pelo genoma celular.

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

ABSTRACT

Bone metabolism is one of the main influencers in the development of new techniques and approaches in both Medicine and Dentistry. Understanding their molecular mechanisms is critical to the success of clinical treatments. Many studies have shown the potential of mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue repair and preservation, as they have the capacity for self-renew and differentiation in cell multilineage. In the oral cavity, PDLSCs (periodontal ligament stem cells) can be found in the periodontal ligament and have the potential for osteogenic differentiation. However, before these cells can serve their purposes in clinical applications, further research is needed to understand the mechanisms involved in their osteogenic potential. To this end, this research aims to identify the possible causes of the heterogeneity of osteogenic potentials among PDLSCs by analyzing and comparing the transcriptional profile of PDLSCs with different osteogenic potentials (high and low) - at baseline and also after osteogenic induction *in vitro* for 10 days - process that will be performed from transcriptome (or RNA-Seq), which consists of the analysis of all the transcripts expressed by the cellular genome.

Keywords: Transcriptome. RNA-Seq. Cell. Periodontal. Osteogenesis. Signaling Pathways.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CONCLUSÃO.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo tecido conjuntivo especializado que possui a característica de se mineralizar. Esse caráter particular permite-lhe desempenhar importantes funções, como sustentação, proteção e reserva metabólica de íons minerais, como o cálcio e o fósforo [1]. Ele é constituído por uma matriz extracelular, dividida em uma parte orgânica (35%, predominantemente constituída por colágeno tipo I) e uma parte inorgânica (65%, predominantemente constituída por hidroxiapatita), além dos elementos celulares como: osteoblastos, responsáveis pela formação da parte orgânica da matriz extracelular; osteoclastos, responsáveis pela reabsorção da matriz extracelular; osteócitos e células de revestimento, atuantes na remodelação do tecido ósseo [2,3].

É importante observar que o desequilíbrio nas funções desses elementos pode alterar a homeostase metabólica do osso, desencadeando distúrbios sistêmicos como a osteoporose, a doença de Paget, a osteomalácia e a osteopetrose [4], podendo também levar a distúrbios locais, como as ossificações ectópicas e a calcificação vascular na doença renal crônica [5].

Nesse sentido, a perda óssea é considerada um desafio na Odontologia, principalmente a perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal avançada, considerada a 11ª doença mais prevalente em todo o mundo [6] e sendo a principal causa de perda dentária em adultos [7]. Em geral, a doença periodontal afeta cerca de 20-50% da população global [8] e está associada a várias doenças sistêmicas. Estudos mostram um aumento de 19% no risco de doença cardiovascular, devido à periodontite, chegando a 44% entre indivíduos com 65 anos ou mais [9-11].

A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o combate da doença periodontal baseia-se no emprego de estratégias preventivas integradas de saúde pública, com foco na abordagem dos fatores de risco tanto sistêmicos, como artrite reumatoide [12], doença renal crônica [13] e obesidade [14], quanto locais, como tabagismo [15] e má-higiene bucal [16], que podem aumentar a gravidade da doença periodontal e, conseqüentemente, a reabsorção óssea [17].

Além das medidas preventivas, as intervenções não-cirúrgicas, como aplainamento radicular, antibioticoterapia, laserterapia e ozonioterapia, são

amplamente usadas no tratamento da doença periodontal. Intervenções cirúrgicas, como as regenerações teciduais guiadas, enxertos ósseos e de tecido mole e aplicações de proteínas estimuladoras de tecidos, são empregadas principalmente na reparação dos tecidos periodontais perdidos. Nesse sentido, diversas estratégias de regeneração óssea foram propostas e, recentemente, as MSCs emergiram como candidatas promissoras nas terapias regenerativas do tecido periodontal. Trata-se, nesse caso, de células adultas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares como adipogênica, condrogênica, neurogênica e osteogênica [18-21].

Na Medicina, estão sendo investigados os potenciais terapêuticos dessas células para tratar doenças e distúrbios degenerativos como: doença de Parkinson [22,23], doença de Alzheimer [24,25], esclerose lateral amiotrófica [26], esclerose múltipla [27,28], doença degenerativa do disco [29-31], doença degenerativa da retina [32,33], infarto do miocárdio [34] e *diabetes mellitus* tipo 1 [35]. Também foi demonstrado que o uso de quimiocinas e citocinas derivadas das MSCs melhorou a eficácia do tratamento de doenças autoimunes [36-38].

De acordo com os critérios estabelecidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*, são consideradas MSCs células que (a) apresentem aderência em plástico quando mantidas em condições padrão de cultivo celular, (b) exibam morfologia fibroblastóide, (c) expressem marcadores específicos de agrupamento de diferenciação (CD) de MSC (CD73, CD90 e CD105) e (d) não possuam CD14, CD19, CD34 e CD45 [39,40].

A medula óssea é a principal fonte de MSCs, denominadas BMSCs (*bone marrow stem-cells*), porém células mesenquimais também podem ser obtidas por meio de vários outros tecidos tais como: adiposo, muscular, sanguíneo, do cordão umbilical, da placenta e fetal, e também por meio do líquido amniótico [41]. Na cavidade oral (Fig. 1), podem ser extraídas dos tecidos dentários como: polpa (*dental pulp stem-cells*, DPSCs), papila apical (*stem-cells of apical papilla*, SCAPs) e ligamento periodontal [42].

As PDLSCs são capazes de se diferenciar em células do tecido adiposo, cartilaginoso ou ósseo [44]. McCulloch, em 1985, foi o primeiro a sugerir as células progenitoras perivasculares do ligamento periodontal de ratos como células-tronco

[45]. Em 2004, Seo et al. foram capazes de isolar PDLSCs e confirmar sua capacidade de diferenciação em células semelhantes a cementoblastos, adipócitos e células formadoras de colágeno [46].

Outra característica das PDLSCs é possuir taxa de proliferação celular maior que as BMSCs. Resultados prévios desse grupo de pesquisa confirmaram a observação de que as taxas de proliferação das PDLSCs podem ser maiores que as das BMSCs. Também foi constatado que populações celulares com a mesma origem, mas de diferentes doadores, podem apresentar potenciais osteogênicos distintos, o que pode influenciar na capacidade de diferenciação celular e impactar diretamente na qualidade e quantidade do tecido ósseo formado (resultados não publicados).

Tanto fatores técnicos laboratoriais, como método de isolamento, tipo de superfície da cultura, meio de cultura e densidade celular, quanto fatores intrínsecos à população celular, como diferenças na origem das MSCs, idade do doador, gênero, genética e epigenética, podem afetar a capacidade proliferadora, as propriedades imunogênicas e também a diferenciação celular [47-49].

Essa diferenciação ocorre por meio de proteínas chamadas fatores de transcrição, que se ligam à molécula de DNA e induzem a diferenciação e mudança fenotípica em uma determinada linhagem celular [50]. Os fatores de transcrição são regulados por vias de sinalização, que consistem em cascatas de eventos moleculares extra e intracelular, que culminam na expressão gênica desses fatores.

Na osteogênese, as principais vias de sinalização são a TGF- β /BMP (*Transforming Growth Factor-beta/Bone Morphogenic Protein*), a Wnt (*Wingless-Type*) canônica (Wnt/ β -catenina) e as não-canônicas (Wnt/ Ca^{2+} e Wnt/polaridade de célula planar) [51,52]. Diferenças na regulação molecular dessas vias podem justificar a heterogeneidade entre os potenciais osteogênicos nas PDLSCs.

A análise do conjunto de todos os transcritos expressos pelo amplo genoma dessas populações (Transcriptoma ou RNA-Seq) pode auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos regulatórios das vias de sinalização e esclarecer essas diferenças. O RNA-Seq é um método de análise que utiliza o sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation Sequencing, NGS*) para revelar a presença, a quantidade e as mudanças de transcritos em uma amostra biológica em um determinado momento.

Constata-se que a análise do transcriptoma celular em constante mudança leva a uma abordagem imparcial e sistemática para obter informações sobre vias biológicas e mecanismos moleculares importantes para a regulação celular em um ambiente neutro em hipóteses [53-56]. Sendo assim, o presente estudo pretende analisar e comparar, por meio do RNA-Seq, a expressão gênica diferencial em PDLSCs com diferentes potenciais para formação óssea, em níveis basais e também após 10 dias de indução osteogênica *in vitro*, com o intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na heterogeneidade desses potenciais.

2. CONCLUSÃO

Por fim, foi possível concluir que a diferença de potencial osteogênico entre as h-PDLCs e I-PDLCs pode estar relacionada ao comprometimento do destino celular inicial das I-PDLCs e à regulação da β -catenina pela via canônica da Wnt.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Universidade de Coimbra; 2012.
2. Guyton AC. Fisiologia Humana. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Interamericana; 1976.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 12ª edição. Guanabara: Koogan; 2013.
4. Kierszenbaum AL. Histologia e Biologia Celular. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
5. Kanbay M, Goldsmith D, Akcay A, Covic A. Phosphate - the silent stealthy cardiorenal culprit in all stages of chronic kidney disease: a systematic review. *Blood Purif* 2009; 27: 220-30.
6. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390 (10100): 1211-1259.
7. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontite em doenças reumáticas sistêmicas. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5: 218–24.
8. Sanz M, D’Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease-scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: A review of the literature. *Eur Heart J Suppl*. 2010; 12(Suppl B): B3–12.
9. Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95: 559–69.
10. Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*. 2008; 23: 2079–86.
11. Blaizot A, Vergnes JN, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M. Doenças periodontais e eventos cardiovasculares: Meta-análise de estudos observacionais. *Int Dent J*. 2009; 59: 197–209.
12. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12: 218.

13. Ioannidou E, Swede H. Disparities in periodontitis prevalence among chronic kidney disease patients. *J Dent Res*. 2011; 90: 730–4.
14. Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: A systematic review. *J Periodontol*. 2015; 86: 766–76.
15. Bergstrom J. Smoking rate and periodontal disease prevalence: 40-year trends in Sweden, 1970-2010. *J Clin Periodontol*. 2014; 41: 952–7.
16. de Oliveira C, Watt R, Hamer M. Toothbrushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: Results from Scottish Health Survey. *BMJ*. 2010; 340: c2451.
17. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: The WHO approach. *J Periodontol*. 2005; 76: 2187–93.
18. Hemmingsen M, Vedel S, Skafté-Pedersen P, Sabourin D, Collas P, Bruus H, et al. The role of paracrine and autocrine signaling in the early phase of adipogenic differentiation of adipose derived stem cells. *PLoS ONE*. 2013; 8(5): e63638–e63638.
19. Moghadam FH, Tayebi T, Dehghan M, Eslami G, Nadri H, Moradi A, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes after short term culture in alkaline medium. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2014; 8(4): 12–19.
20. Tropel P, Platet N, Platel JC, Noel D, Albrieux M, Benabid AL, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24(12): 2868–2876.
21. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*. 2009; 10(1): 57–63.
22. Jamali F, Ma Hattab D, Amman J, Awidi A. Use of mesenchymal stem cells in Parkinson disease (PD). 2018.
23. Kim H, Lee H, Kang J, Bae S, Kim C, Lee S, et al. Dual effects of human placenta-derived neural cells on neuroprotection and the inhibition of neuroinflammation in a rodent model of Parkinson's disease. *Cell Transplantation*. 2018; 27: 814–830.
24. Cui Y, Ma S, Zhang C, Cao W, Liu M, Li D, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*. 2017; 320: 291–301.

25. Han L, Zhou Y, Zhang R, Wu K, Lu Y, Li Y, et al. MicroRNA let-7f-5p promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by targeting caspase-3 in Alzheimer disease model. *Frontiers in Neuroscience*. 2018; 12: 333.
26. Bonafede R, Mariotti R. ALS pathogenesis and therapeutic approaches: The role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017; 11: 80–80.
27. Harris VK, Stark J, Vyshkina T, Blackshear L, Joo G, Stefanova V, et al. Phase I trial of intrathecal mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in progressive multiple sclerosis. *eBioMedicine*. 2018; 29: 23–30.
28. Nasri F, Mohtasebi MS, Hashemi E, Zarrabi M, Gholijani N, Sarvestani EK. Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells-derived neural progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Journal of Stem Cells*. 2018; 11(1): 68–77.
29. Ahn J, Park EM, Kim BJ, Kim JS, Choi B, Lee SH, et al. Transplantation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells highly expressing TGF β receptors in a rabbit model of disc degeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6: 190.
30. Beeravolu N, Brougham J, Khan I, McKee C, Perez-Cruet M, Chaudhry GR. Human umbilical cord derivatives regenerate intervertebral disc. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018; 12(1): e579–e591.
31. Perez-Cruet M, Beeravolu N, McKee C, Brougham J, Khan I, Bakshi S, et al. Potential of human nucleus pulposus-like cells derived from umbilical cord to treat degenerative disc disease. *Neurosurgery*. 2018; 84: 272–283.
32. Wang Y, Zhang D, Shen B, Zhang Y, Gu P. Stem/progenitor cells and biodegradable scaffolds in the treatment of retinal degenerative diseases. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2018; 13(3): 160–173.
33. Zhang M, Zhang F, Sun J, Sun Y, Xu L, Zhang D, et al. The condition medium of mesenchymal stem cells promotes proliferation, adhesion and neuronal differentiation of retinal progenitor cells. *Neuroscience Letters*. 2017; 657: 62–68.
34. Chen XQ, Chen LL, Fan L, Fang J, Chen ZY, Li WW. Stem cells with FGF4-bFGF fused gene enhances the expression of bFGF and improves myocardial repair in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 447(1): 145–151.

35. Evangelista AF, Vannier-Santos MA, de Assis Silva GS, Silva DN, Juiz PJL, Nonaka, CKV, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15(1): 189.
36. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. *Stem Cells International*, 2018.
37. Xu J. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for systemic lupus erythematosus. *Advances in Experimental Medicine Biology*. 2018; 1089: 73–85.
38. Zhang W, Feng YL, Pang CY, Lu FA, Wang YF. Transplantation of adipose tissue-derived stem cells ameliorates autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice: Modulation of the balance between Th17 and Treg. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2018; 78: 82–88.
39. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-17.
40. Robey P. Mesenchymal stem cells: Fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Research*. 2017; 6: 1524.
41. Brown C, McKecasae C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 13: 1738– 1755.
42. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88 (9): 792-806.
43. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediatric dentistry*. 2013; 35(2): 129-140.
44. Saito MT, Salmon CR, Amorim BR, Ambrosano GM, Casati MZ, Sallum EA, et al. Characterization of highly osteoblast/cementoblast cell clones from a CD105-enriched periodontal ligament progenitor cell population. *J Periodontol*. 2014; 85(6): e205-11.
45. McCulloch C. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat. Rec*. 1985; 211(3): 258–62.
46. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429): 149-155.

47. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Resv. Bras. Hematol. Hemeoter.* 2009; 31(1): 25-35.
48. Zhang J, An Y, Gao LN, Zhang YJ, Jin Y, Chen FM. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials.* 2012; 33: 6974-6986.
49. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine.* 2016; 37: 115-125.
50. Wu H, Whitfield TW, Gordon JA, Dobson JR, Tai PW, van Wijnen AJ, et al. Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol.* 2014; 15(3): R52.
51. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2): 272–288.
52. Hayrapetyan A., Jansen JA, van den Beucken JJJP. Signaling Pathways Involved in Osteogenesis and Their Application for Bone Regenerative Medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 2015; 21(1): 75–87.
53. Chu Y, Corey DR. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics.* 2012; 22 (4): 271–4.
54. Ayturk UM, Jacobsen CM, Christodoulou DC, Gorham J, Seidman JG, Seidman CE, et al. An RNA-seq protocol to identify mRNA expression changes in mouse diaphyseal bone: applications in mice with bone property altering Lrp5 mutations. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(10): 2081-93.
55. Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M. Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone.* 2014; 67: 23-32.
56. Keschull M, Hulsmann C, Hoffmann P, Papapanou PN. Genome-Wide Analysis of Periodontal and Peri-Implant Cells and Tissues. *Methods Mol Biol.* 2017; 1537: 307-326.