

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

**DMSO COMO MODULADOR TRANSCRICIONAL EM
CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE
HUMANOS DURANTE A OSTEOGÊNESE**

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

BEATRIZ GANHITO FRANÇOSO

**SÃO PAULO
2021**

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

**DMSO COMO MODULADOR TRANSCRICIONAL EM
CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE
HUMANOS DURANTE A OSTEOGÊNESE**

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.

BEATRIZ GANHITO FRANÇOSO

**SÃO PAULO
2021**

Françoso, Beatriz Ganhito.

DMSO como modulador transcricional em células do ligamento periodontal de humanos durante a osteogênese / Beatriz Ganhito Françoso. - 2021.

19 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

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

1. Transcriptoma. 2. RNA-Seq. 3. Célula. 4. Periodontal. 5. Osteogênese. 6. Vias de Sinalização. 7. Genes. I. Andia, Denise Carleto (orientadora). II. Título.

BEATRIZ GANHITO FRANÇOSO

**DMSO COMO MODULADOR TRANSCRICIONAL EM
CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE
HUMANOS DURANTE A OSTEOGÊNESE**

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. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ___/___/___

Prof. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto
Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho - UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por acreditarem em mim e me apoiarem. Agradeço principalmente à minha mãe, Adriana Ganhito, que me proporcionou um ambiente de incentivo, permitindo que eu me ausentasse de outras obrigações e sendo minha maior inspiração.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia, que me acolheu e me apresentou, desde a graduação, o mundo científico e a epigenética, agradeço por toda sua dedicação e orientações prestadas neste trabalho e pelo compartilhamento de seu conhecimento que abriu um novo mundo e um olhar diferente para minhas ações clínicas.

Aos meus colegas do grupo Francesca Racca, Rahyza Inácio Freire de Assis e Rogério Salinas Ferreira, que me ajudaram e ensinaram muito, tendo sido fundamentais para todo o processo deste trabalho.

A todos os professores e colegas do programa de pós-graduação que me acompanharam nessa jornada, sempre trazendo algo a agregar.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho, pois, sem essas colaborações, nada seria possível.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

RESUMO

Compreender mecanismos moleculares na formação do tecido ósseo é fundamental para o sucesso das terapias de regeneração tecidual, impulsionando o desenvolvimento de novas abordagens médicas. Pesquisas têm demonstrado o potencial de células mesenquimais do ligamento periodontal humano (PDLCs) na reparação tecidual; porém, sua heterogeneidade no potencial osteogênico pode impactar nos resultados clínicos esperados. Dimetilsulfóxido (DMSO) difunde-se pelas membranas biológicas e, embora a literatura forneça informações sobre sua ação como agente osteoindutor, mecanismos e vias não foram totalmente caracterizados. Nesse sentido, o objetivo foi investigar mecanismos regulatórios associados ao baixo potencial osteogênico de PDLCs (I-PDLCs) e definir se genes e vias de sinalização relacionadas à osteogênese podem ser ativadas pelo DMSO. Inicialmente, as I-PDLCs foram caracterizadas quanto ao tempo de duplicação celular (PDT), multipotencialidade (citometria de fluxo) e potencial osteogênico (Alizarin Red - AR). Após plaqueamento e adesão celular, as I-PDLCs ou foram induzidas à diferenciação osteogênica somente (OM_low) ou foram pré-tratadas com DMSO 0.025 % por 72 h (OM_DMSO_low) e então induzidas à diferenciação osteogênica. Após 21 dias, foi realizada a coloração com AR. Após 10 dias, foi extraído RNA de 3 experimentos independentes, o sequenciamento foi realizado e as análises de Bioinformática foram conduzidas. Para ser classificada como I-PDLCs, esta população celular foi comparada a outra PDLCs, que demonstrou maior potencial para deposição de nódulos minerais *in vitro* ($p \leq 0.01$). A fenotipagem mostrou a presença dos marcadores de superfície celular CD105 e CD166 e ausência de CD34 e CD45, indicando presença de células mesenquimais indiferenciadas; o PDT foi avaliado em 29,78 h. AR aos 21 dias demonstrou aumento de nódulos minerais *in vitro*, no grupo OM_DMSO_low ($p \leq 0.01$ x OM_low). O transcriptoma revelou que, dos genes que apresentaram $\log_2\text{FoldChange} < -1.5$ ou > 1.5 (genes diferencialmente expressos - DGEs), 824 eram do grupo OM_DMSO_low e 963 no grupo OM_low, sendo 46 DGEs em comum. Com relação a genes que participam de vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica, *ALPL*, *BGLAP*, *COL1A1* e *SP7* foram mais expressos em OM_DMSO_low ($\log_2\text{FoldChange}$). As análises de enriquecimento gênico destacaram o DMSO como modulador de várias vias de sinalização associadas à osteogênese, como Hedgehog (Hh) e Notch. Nas análises *Hallmarks*, *KEGG* e

WikiPathways, os ligantes da via Hh (*DHH*, *IHH* e *SHH*), os receptores de membrana (*PTCH1* e *SMO*) e os fatores de transcrição (FTs) *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* foram mais enriquecidos, enquanto que o regulador negativo da via, o *RAB23*, foi menos enriquecido em OM_DMSO_low, de acordo com o NOM p value $\leq 0,05$ e FDR q value $\leq 0,25$. De acordo com esses mesmos parâmetros, os receptores da via Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2* e *NOTCH3*), os ligantes *JAG1* e *DLL3* e o FT *HES1* também foram mais enriquecidos em OM_DMSO_low. O DMSO modula vias de sinalização e genes ligados à osteogênese, o que pode estar relacionado 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

The understanding of molecular mechanisms involved in bone tissue formation is crucial for the success of tissue regeneration therapies, driving the development of new medical approaches. Researches have demonstrated periodontal ligament cells (PDLCs) are promising candidates in tissue repair; however, the mechanisms underlying their heterogenous commitment to osteogenesis might have impact on clinical results. Dimethylsulfoxide (DMSO) can diffuse through biological membranes; although the literature brings some information about its osteogenic properties, the mechanisms and signaling pathways are not yet characterized. Here, we investigated the regulatory mechanisms related to the low osteogenic potential of PDLCs (I-PDLCs), aiming to define genes and signaling pathways that could be modulated by DMSO to increase the osteogenic potential. I-PDLCs were characterized regarding their osteogenic potential (Alizarin Red, AR), cell surface markers (Flow cytometry) and population doubling time (PDT). After plating and cellular adhesion in standard culture medium, I-PDLCs were pre-treated with DMSO (0.025 %) (OM_DMSO_low) for 72 h and submitted to osteogenic induction *in vitro*, or, after 72 h, cells were submitted to osteogenic induction *in vitro* (OM_low), for 10 and 21 days. After 21 days, the AR staining was performed. After 10 days, the RNA from 3 independent experiments were extracted, the sequencing was performed and the Bioinformatic analysis were conducted accordingly. The I-PDLCs were classified as such, after comparison with another PDLCs, which have demonstrated increased capacity to mineral nodules formation *in vitro* ($p \leq 0.01$). The cell phenotyping showed the presence of surface markers CD105 and CD166 and the absence of CDC34 and CD45, a characteristic scenario of mesenchymal cells; the PDT assay indicated 29,78 h for cellular duplication. At 21 days, the AR demonstrated an increase in the mineral nodules' formation *in vitro*, in the OM_DMSO_low group ($p \leq 0.01$ x OM_low). The transcriptome analysis revealed 824 differentially expressed genes (DGEs) in the OM_DMSO_low and 963 in the OM_low, with 46 DGEs in common, according to $\log_2\text{FoldChange} < -1.5$ or > 1.5 . Some main genes related to classical signaling pathways associated to osteogenesis, such as *ALPL*, *BGLAP*, *COL1A1* and *SP7*, were found to be more expressed in the OM_DMSO_low ($\log_2\text{FoldChange}$). The enrichment gene score analysis highlighted DMSO as capable of modulating some signaling pathways related to osteogenesis, such as Hedgehog (Hh) and Notch. In the *Hallmarks*, *KEGG* and

WikiPathways analysis, the Hh cell ligands (*DHH*, *IHH* and *SHH*), the membrane receptor (*PTCH1*) and the transcription factors (TFs) *GLI1*, *GLI2* and *GLI3* were more enriched, while the negative regulator *RAB23* was less enriched in OM/DMSO_low, according to NOM p value $\leq 0,05$ and FDR q $\leq 0,25$ value analysis. Yet, according to these same analysis parameters, the Notch signaling pathway receptors (*NOTCH1*, *NOTCH2* e *NOTCH3*), the cell ligands *JAG1* e *DLL3* and the TF *HES1* were also enriched in OM_DMSO_low. DMSO can modulate signaling pathways and genes related to osteogenesis, increasing the *in vitro* osteogenic potential of PDLCs presenting low osteogenic potential.

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por uma porção orgânica, composta principalmente por fibras colágenas, e outra inorgânica, composta por minerais, como cálcio e fosfato. Essas características lhe conferem propriedades únicas, como dureza e resistência mecânica, essenciais para a sustentação do corpo e proteção dos órgãos vitais (Judas et al., 2012). Possui também células específicas que agem tanto na formação quanto na reabsorção óssea, como osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. O processo de osteogênese é bastante complexo e intrincado, sendo a expressão de transcritos de genes, envolvidos na osteogênese, regulada por complexos sistemas de interações moleculares intra e extracelulares denominados vias de sinalização. Na osteogênese, as principais vias de sinalização são as TGF- β /BMPs (*Transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein*) canônica e não-canônica, as Wnts (*Wingless-Type*) canônica, não-canônica e de polaridade planar, a *Hedgehog* (Chen, Deng, Li, 2012; Hayrapetyan, Jansen, van den Beucken, 2015) e a *Notch* (Luo et al., 2019), que podem atuar concomitantemente, sendo não excludentes umas das outras.

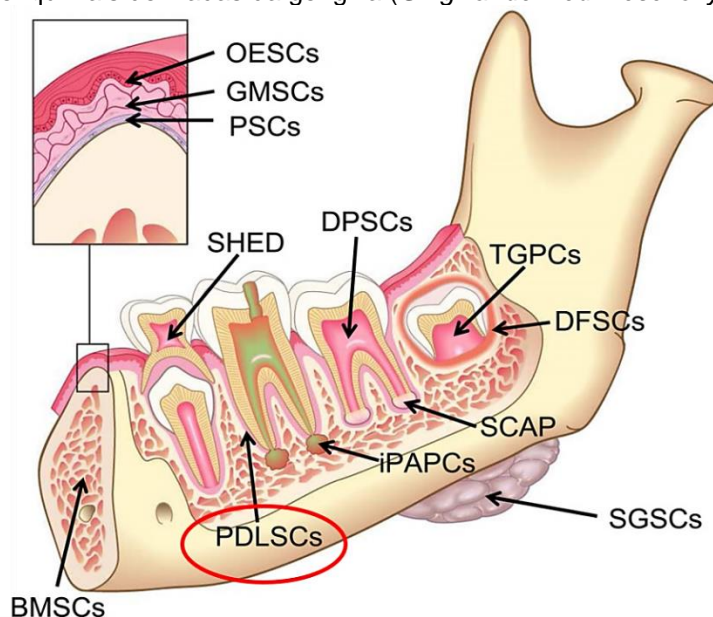
O desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea, porém, pode causar distúrbios no metabolismo e na homeostase mineral, resultando no surgimento de osteoporose, osteosarcomas ou no agravamento de doenças pré-existentes, como na doença periodontal avançada (Huang, Xu, Lin, 2020; Siddiqui, Partridge, 2016). Em adição, um dos problemas clínicos mais difíceis de serem resolvidos é o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico (Huang, Xu, Lin, 2020). Para os casos de doença periodontal avançada e reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico, o uso de células mesenquimais indiferenciadas (*mesenchymal stem cells*, MSCs) tem sido proposto como um tratamento promissor. Ademais, estudos recentes demonstraram que as MSCs podem promover a regeneração periodontal (Suaid et al., 2012; Tomokiyo et al., 2018; Tomokiyo, Wada, Maeda, 2019; Winning, El Karim, Lundy 2019).

As MSCs são células adultas que possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares (Dominici et al., 2006). Suas principais características, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*, são: (a) apresentar aderência em plástico quando mantidas em condições padrão de cultivo

celular, (b) exibir morfologia fibroblastóide, (c) expressar marcadores específicos de agrupamento de diferenciação (CD) de MSC (CD73, CD90 e CD105) e (d) não expressar CD14, CD19, CD34 e CD45 (Robey, 2017).

Atualmente, muitos estudos são realizados com MSCs, sendo que as fontes mais utilizadas são: medula óssea (*bone marrow mesenchymal stem cells*, BMMSCs), tecido adiposo (*adipose tissue stem cells*, ASCs), cordão umbilical (*umbilical cord stem cells*, UCSCs) e placenta (*placental mesenchymal stem cells*, PMSCs). Na cavidade oral, podem ser obtidas de germes dentários (*tooth germ progenitor cells*, TGPCs) de dentes decíduos esfoliados (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*, SHED), do folículo dentário (*dental follicle stem cells*, DFSCs), da glândula salivar (*salivary gland stem cells*, SGSCs), da polpa dental (*dental pulp stem-cells*, DPSCs), da papila apical (*stem-cells of apical papilla*, SCAPs), do epitélio oral (*oral epithelial stem cells*, OESCs), da gengiva (*gingival-derived mesenchymal stem cells*, GMSCs) e do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells*, PDLSCs) (Huang, Gronthos, Shi, 2009), como observado na ilustração abaixo:

Figura 1 – Desenho esquemático que ilustra fontes potenciais de células-tronco pós-natais na cavidade oral. Os tipos de células incluem células progenitoras de germes dentários (*Tooth Germ Progenitor Cells* - TGPCs), células-tronco do folículo dentário (*Dental Follicle Stem Cells* - DFSCs), células-tronco da glândula salivar (*Salivary Gland Stem Cells* - SGSCs), células-tronco da papila apical (*Stem Cells of the Apical Papilla* - SCAP), células-tronco da polpa dentária (*Dental Pulp Stem Cells* - DPSCs), células-tronco de dentes humanos decíduos esfoliados (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* - SHED), células-tronco do ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells* - PDLSCs), células-tronco da medula óssea (*Bone Marrow Stem Cells* - BMSCs) e, como ilustrado no destaque, células-tronco epiteliais orais (*Oral Epithelial Stem Cells* - OESCs) e células-tronco mesenquimais derivadas da gengiva (*Gingival-derived Mesenchymal Stem Cells* - GMSCs)



Fonte: Hargreaves, Diogenes, Teixeira (2013).

As PDLSCs possuem a capacidade de se diferenciarem em células do tecido adiposo, cartilaginoso, ósseo e em células semelhantes a cementoblastos e formadoras de colágeno (Saito et al., 2014), sendo assim boas candidatas às terapias de regeneração tecidual. Seo et al. (2004) demonstraram que essas células possuem taxa de proliferação celular maior que as BMMSCs (2004). Liu et al. (2008) utilizaram PDLSCs autólogas em conjunto com hidroxiapatita como veículo para regenerar as estruturas periodontais em um modelo suíno, e, Feng et al. (2010) replicaram essa técnica em uma série de casos clínicos humanos (Feng et al., 2010; revisto em: Bassir et al., 2016). Além disso, é importante observar que a obtenção de PDLSCs através de exodontias é mais fácil que as BMMSCs.

Contudo, resultados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que PDLSCs obtidas do mesmo sítio periodontal, mas de diferentes doadores, podem apresentar potenciais osteogênicos distintos *in vitro*, o que pode impactar diretamente na qualidade e quantidade do tecido ósseo formado.

O dimetilsulfóxido (DMSO), uma molécula anfipática, é utilizado frequentemente em estudos biológicos devido a sua grande versatilidade como solvente e veículo de vários agentes terapêuticos, bem como criopreservante celular. Como veículo para terapia medicamentosa, penetra e difunde-se rapidamente através das membranas biológicas. Muitos estudos relatam seu uso no tratamento de lesões de queimadura (Pielesz et al., 2018), tratamento de doenças cardíacas (Hu et al., 2019), diferenciação hematopoiética de células troncos embrionárias humanas (Wang et al., 2017), entre outros. Entretanto, observamos, em estudos anteriores ao deste grupo, que DMSO 0,025 % aumentou o potencial osteogênico de células mesenquimais (Assis et al., 2018; Assis et al., 2021), sem efeitos citotóxicos para as células estudadas. Porém, os mecanismos pelos quais o DMSO opera, no nível celular e principalmente como agente indutor de diferenciação celular, ainda não são bem compreendidos.

Dessa forma, ressalta-se que, para uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios das vias de sinalização associadas à osteogênese, é necessária uma análise transcricional do amplo genoma. O RNA-Seq é um método de análise que utiliza o sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) e identifica genes diferencialmente expressos, permitindo uma investigação sistemática e imparcial das informações biológicas celulares em larga escala ou em todo o genoma (Kebschull et al., 2017; Qi, Schlapbach, Rehrauer, 2017).

Nesse intuito, o objetivo desse estudo foi investigar se genes e vias de sinalização relacionadas à osteogênese podem ser ativadas pelo DMSO, por meio do RNA-Seq. Acredita-se, portanto, que explorar os mecanismos celulares subjacentes ao comprometimento à osteogênese e a possibilidade de aumento do potencial osteogênico poderá ser benéfico em abordagens clínicas de regeneração tecidual.

2 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que o pré-tratamento com DMSO modula positivamente vias de sinalização associadas à osteogênese, como as vias Hedgehog e Notch, bem como genes marcadores osteogênicos, como *ALPL*, *BGLAP*, *COL1A1* e *SP7*. Este enriquecimento pode estar relacionado ao aumento do potencial osteogênico observado *in vitro*, após pré-tratamento com DMSO, em PDLCs com baixo potencial osteogênico.

REFERÊNCIAS

Assis RIF, Schmidt AG, Racca F, da Silva Ra, Zambuzzi WF, Silvério KG, et al. DNMT1 inhibitor restores RUNX2 expression and mineralization in periodontal ligament cells. *DNA and Cell Biology*, 2021.

Assis RIF, Wiench M, Silvério KG, da Silva RA, Feltran GDS, Sallum EA, et al. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207873.

Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, et al. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):50-61.

Blighe K, Rana S, Lewis M. Enhanced Volcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.4.0. [Internet]. 2019. [citado em: 2019 dezembro 15]. Disponível em: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.

Carmona H, Valadez H, Yun Y, Sankar J, Estala L, Gomez FA. Development of microfluidic-based assays to estimate the binding between osteocalcin (BGLAP) and fluorescent antibodies. *Talanta*. 2015 Jan;132:676-9.

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.

Cheung WM, Ng WW, Kung AW. Dimethyl sulfoxide as an inducer of differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett*. 2006 Jan 9;580(1):121-6.

Czysk K, Minger S, Thomas N. DMSO efficiently down regulates pluripotency genes in human embryonic stem cells during definitive endoderm derivation and increases the proficiency of hepatic differentiation. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0117689.

Deng A, Zhang H, Hu M, Liu S, Gao Q, Wang Y, et al. Knockdown of Indian hedgehog protein induces an inhibition of cell growth and differentiation in osteoblast MC3T3E1 cells. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):7987-7992.

Deregowski V, Gaggero E, Priest L, Rydzziel S, Canalis E. Notch1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/bcatenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 2006, 281:6203e6210.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-17.

Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* 2008, 14:299e305.

Evans TM, Ferguson C, Wainwright BJ, Parton RG, Wicking C. Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway. *Traffic* 2003;(12):869-84.

Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.* 2010;16(1):20-8.

Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):28067-78.

Gu Z. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics.* 2016.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2013 Mar;39(3 Suppl):S30-43. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.025. PMID: 23439043; PMCID: PMC3589799.

Hasan MR, Takatalo M, Ma H, Rice R, Mustonen T, Rice DP. RAB23 coordinates early osteogenesis by repressing FGF10-pERK1/2 and GLI1. *Elife* 2020;9:e55829.

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.

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; 16:169.

Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med.* 2008;14(3):306–314

Hu H, Xue J, Dong R, Zhao Y, Song C, Zhao H, et al. STAT3 Phosphorylation Mediating DMSO's Function on Fetal Cardiomyocyte Proliferation with Developmental Changes. *Int Heart J.* 2019;60(2):392-399.

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.

Huang JH, Xu Y, Lin FY. The inhibition of microRNA-326 by SP1/HDAC1 contributes to proliferation and metastasis of osteosarcoma through promoting SMO expression. *J Cell Mol Med.* 2020;24(18):10876-10888.

Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells.* 2006;24 (11):2549-56.

Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Universidade de Coimbra, 2012.

Kazmers NH, McKenzie JA, Shen TS, Long F, Silva MJ. Hedgehog signaling mediates woven bone formation and vascularization during stress fracture healing. *Bone*. 2015;81:524-532.

Kebschull 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.

Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018 Feb 8;172(4):650-665.

Liu N, Shi S, Deng M, Tang L, Zhang G, Liu N, et al. High levels of β -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011; 26(9):2082-2095.

Liu W, Zhang L, Xuan K, Hu C, Liu S, Liao L, et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res*. 2018 Sep 11;6:27.

Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008;26(4):1065-73.

Lories RJ, Corr M, Lane NE. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Jun;9(6):328-39.

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

Luo J, Sun P, Siwko S, Liu M, Xiao J. The role of GPCRs in bone diseases and dysfunctions. *Bone Res*. 2019; 7:19.

Oh JH, Park SY, de Crombrughe B, Kim JE. Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Feb 24;418(4):634-40.

Pal R, Mamidi MK, Das AK, Bhonde R. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch Toxicol*. 2012; 86(4):651-61.

Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. 2017.

Pielesz A, Gawłowski A, Biniś D, Bobiński R, Kawecki M, Klama-Baryła A, et al. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in ex-vivo examination of human skin burn injury treatment. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2018 May 5;196:344-352.

Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(6):1195-1206.

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.

Robey P. Mesenchymal stem cells: Fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Research*. 2017; 6:1524.

Ross DA, Hannenhalli S, Tobias JW, Cooch N, Shiekhattar R, Kadesch T. Functional analysis of Hes-1 in preadipocytes. *Mol Endocrinol*. 2006;20(3):698–705.

Ross DA, Rao PK, Kadesch T. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3–L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol*. 2004;24(8):3505–3513.

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.

Sambo D, Li J, Brickler T, Chetty S. Transient Treatment of Human Pluripotent Stem Cells with DMSO to Promote Differentiation. *J Vis Exp*. 2019;(149):10.3791/59833. Published 2019 Jul 17. doi:10.3791/59833.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429):149-155.

Shamseldin H, Alazami AM, Manning M, Hashem A, Caluseiu O, Tabarki B, et al. RTTN Mutations Cause Primary Microcephaly and Primordial Dwarfism in Humans. *Am J Hum Genet*. 2015 Dec 3;97(6):862-8.

Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, et al. Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul;18(7):2411-8.

Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(3):233-245.

Stouffs K, Moortgat S, Vanderhasselt T, Vandervore L, Dica A, Mathot M, et al. Biallelic mutations in RTTN are associated with microcephaly, short stature and a wide range of brain malformations. *Eur J Med Genet*. 2018 Dec;61(12):733-737.

Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TR, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH Jr, et al. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2012 Apr;39(4):377-84.

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

Thaler R, Spitzer S, Karlic H, Klaushofer K, Varga F. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*. 2012 Jun 1;7(6):635-51.

Tian Y, Xu Y, Xue T, Chen L, Shi B, Shu B, et al. Notch activation enhances mesenchymal stem cell sheet osteogenic potential by inhibition of cellular senescence. *Cell Death Dis* 2017, 8:e25.

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

Tomokiyo A, Yoshida S, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Maeda H. Detection, Characterization, and Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Ligament Tissue. *Stem Cells Int*. 2018;2018:5450768.

Ugarte F, Ryser M, Thieme S, Fierro FA, Navratil K, Bornhäuser M, et al. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2009, 37:867e875.

Wang HT, Wang MG, Liu X, Su P, Zhang LS, Liu CC, et al. DMSO Promotes Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2017 Jun;25(3):644-649. Chinese.

Wang Y, Ng EL, Tang BL. Rab23: what exactly does it traffic? *Traffic*. 2006 Jun;7(6):746-50. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00416.x. PMID: 16683919.

Winning L, El Karim IA, Lundy FT. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2019;28(15):1050-1058.

Wu F, Jiao J, Liu F, Yang Y, Zhang S, Fang Z, et al. Hypermethylation of Frizzled1 is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. *Exp Mol Med*. 2019 Feb 26;51(2):1-9.

Xing J, Lian M, Shen Q, Feng G, Huang D, Lu X, et al. AGS3 está envolvido na tnf- α diferenciação osteogênica medicada de células-tronco de polpa dentária humana. *Diferenciação*. 2015 Jun;89(5):128-36.

Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):909-13.

Zou S, Chen T, Wang Y, Tian R, Zhang L, Song P, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing lhh promote bone repair. *J Orthop Surg Res*. 2014 Oct 28;9:102.