UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

KALIL WILLIAM ALVES DE LIMA

***Análise da expressão gênica global de células estromais
mesenquimais e de células tronco hematopoéticas
isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes
mellitus do tipo 1***

Ribeirão Preto – 2013

KALIL WILLIAM ALVES DE LIMA

***Análise da expressão gênica global de células estromais
mesenquimais e de células tronco hematopoéticas
isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes
mellitus do tipo 1***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Dra. Kelen C. R. Malmegrim de Farias

Ribeirão Preto - 2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

de Lima, Kalil William Alves

Análise da expressão gênica global de células estromais mesenquimais e de células tronco hematopoéticas isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1. Ribeirão Preto, 2012.

184 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

FOLHA DE APROVAÇÃO

KALIL WILLIAM ALVES DE LIMA

Análise da expressão gênica global de células estromais mesenquimais e de células tronco hematopoéticas isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

À minha família,

Ao Prof. Dr. Júlio César Voltarelli

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela constante presença em minha vida. Por me guiar, proteger e, em momento algum, me abandonar.

À minha maravilhosa família. Meu paizão Nilton e minha mamãe, Zenilda. Ao meu maior tesouro, minha irmã, Katiuscia! Agradeço por sempre me apoiarem, me mimarem demais e, acima de tudo, me amarem de maneira incondicional. Independente da distância, sei que estamos sempre juntos! Amo vocês, mais do que tudo!

À família Mello, gerada pelos meus avós, Luzia e Silvino. Meu cunhado, Nilton e a toda sua família. Eu não seria absolutamente nada sem todos vocês!

Ao grande e eterno mestre, Dr. Júlio César Voltarelli, que nos deixou inúmeras demonstrações de amor à ciência e, principalmente, amor ao próximo. Espero que ao menos um pouquinho do senhor possa ter permanecido em mim. Foi um prazer enorme ter convivido com um homem tão especial. Descanse em paz!

À Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, por ter assumido nosso grupo em um momento tão triste e difícil. Obrigado pela dedicação, constante bom humor e ensinamentos.

Aos colaboradores Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, Dr. Daniel Guariz Pinheiro, Dra. Simone Kashima Haddad, Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci e aos respectivos laboratórios.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, local em que esse trabalho foi desenvolvido. Agradeço a todos os funcionários, pesquisadores, técnicos, recepcionistas, secretárias, zeladores, jardineiros, guardas, pessoal da biblioteca, computação, almoxarifado, recursos humanos. Enfim, todos contribuíram de alguma maneira para este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Em especial, ao grande exemplo, Dr. João Santana da Silva, pelo esforço, dedicação e amor na formação de pós-graduandos. A todos os outros professores que fazem com que o nosso Programa seja destaque no cenário nacional e internacional. E claro, não posso esquecer da grande amiga e secretária, Ana. Obrigado pelo carinho e atenção durante esses anos.

Aos financiadores desse trabalho, CNPq, FAPESP e Hemocentro de Ribeirão Preto.

Aos pacientes e voluntários que gentilmente participaram desse trabalho, na esperança de um futuro melhor para os pacientes com diabetes tipo 1.

Aos amigos de laboratório: Amanda, Mário, Rafa, Robson, Rô, Bel, Gi, Ueda, Furinho, Mariana, Julinha e Lucas. Em especial, Gislane Lelis Vilela de Oliveira, por compartilhar o desespero das milhares de análises do *array*, pelo entusiasmo, grande amizade, caronas, conselhos e conversas. Além dela, agradeço a quem eu adotei como minha segunda irmã, Júlia Teixeira (Jovem). Jovem, obrigado por me ouvir, me dar conselhos, me fazer rir, me emocionar, pelos almoços, mensagens e ligações compartilhadas ou melhor, obrigado por ser você mesma: tão presente, intensa e importante em minha vida. Sentirei muita falta de todos vocês, foi um prazer fazer parte desse grupo!

Ao pessoal do Laboratório de Polimorfismos Genéticos-UEL. Pela torcida e amizade.

Ao pessoal do futuro laboratório (Laboratório de Inflamação e Dor - LID), em especial ao prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, Jhimmy Talbot e Raphael Sanches Peres, pela ótima recepção, apoio e confiança.

Aos meus grandes amigos de juventude: João Vitor Fagundes e Alison Ciquinato.

Aos amigos da época da faculdade: Fernando Henrique Martins, Marcus Mastine, Camila Souza, Renan Hilário.

Aos grandes amigos que não apenas dividiram as despesas comigo durante esses anos: Diego Luís Costa (Beakman) e Raphael Sanches Peres (Panda). Obrigado pelos ensinamentos e momentos “*maior da hora*” que passamos juntos.

Aos meus amigos, calouros e novos integrantes da nossa casa: Dênis Santana Reis (Zé), Gustavo Quirino (Mozt) e Mikhael Haruo (Mika). Com certeza cresceremos e amadureceremos muito em “família”.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, sugestões e contribuições.

Por fim, a todos que tenham participado direta ou indiretamente desse trabalho e que eu não tenha citado aqui. Muito obrigado!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia das MSCs isoladas de pacientes com T1D e de indivíduos controles..	47
Figura 2. Caracterização imunofenotípica representativa de MSCs isoladas de um paciente com T1D pré-AHSCT.....	48
Figura 3. Diferenciação das MSCs isoladas da medula óssea de doadores controles em adipócitos e osteoblastos.....	49
Figura 4. Diferenciação das MSCs isoladas da medula óssea de pacientes com T1D pré-AHSCT em adipócitos e osteoblastos.....	49
Figura 5. Análise imunofenotípica de HSCs CD34 ⁺ isoladas da medula óssea de um indivíduo controle.....	50
Figura 6. Distribuição das amostras nas 6 lâminas utilizadas para a hibridização dos <i>microarrays</i> das MSCs e HSCs.	52
Figura 7. Dados de hibridização das lâminas de <i>microarrays</i> gerados pelo <i>Agilent Feature extraction software QC report</i>	54
Figura 8. <i>MA plots</i> dos 4 <i>arrays</i> com maior (acima) e menor (abaixo) valor de D.	55
Figura 9. Teste de Hoeffding para a detecção de <i>outliers</i>	56
Figura 10. Representação, em forma de heatmap, das distâncias entre os <i>arrays</i>	56
Figura 11. Representação, em forma de barras, da distância entre as diferentes amostras.	57
Figura 12. Dispersão espontânea das amostras dentre dois componentes principais (PCA) 2D.....	57
Figura 13. Distribuição das amostras quanto à intensidade dos sinais.	58
Figura 14. Distribuição das amostras quanto à intensidade dos sinais, em gráfico de barras.	58
Figura 15. Estimativa das densidades de intensidade das amostras.	59
Figura 16. Dendograma do agrupamento euclidiano das amostras.	60
Figura 17. Heatmap do agrupamento, não supervisionado, das amostras.....	61
Figura 18. Volcano <i>plot</i> das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 (T1D) e MSCs de indivíduos não diabéticos (CTRL).	64
Figura 19. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 e MSCs de indivíduos controles (FC > 2, <i>p</i> < 0.01).	65

Figura 20. Heatmaps da expressão absoluta de Colágenos, Integrinas e Lamininas por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	67
Figura 21. Heatmaps da expressão absoluta de outras moléculas de adesão por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	68
Figura 22. Heatmap da expressão relativa de moléculas de adesão diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.	70
Figura 23. Heatmaps da expressão de moléculas relacionadas à quimiotaxia por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	72
Figura 24. Heatmaps da expressão de peptidases (MMPs e ADAMs) por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	75
Figura 25. Heatmaps da expressão absoluta de citocinas e fatores de crescimento por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	79
Figura 26. Heatmap da expressão relativa de citocinas e fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.....	80
Figura 27. Heatmaps da expressão absoluta de receptores de citocinas e fatores de crescimento por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.....	82
Figura 28. Heatmap da expressão relativa de receptores de citocinas e fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.	86
Figura 29. Heatmap da expressão absoluta (a) e relativa (b) dos fatores de transcrição diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.....	87
Figura 30. Perfil de enriquecimento da via <i>Neuroactive ligand receptor interaction</i>	97
Figura 31. Heatmap da expressão relativa dos genes envolvidos na via <i>Neuroactive ligand receptor interaction</i>	98
Figura 32. Análise da sinalização de receptores acoplados à proteína G em células mesenquimais estromais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	99
Figura 33. Volcano <i>plot</i> das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pré (T1D) e pós-AHSCT (D180).	100

Figura 34. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pré e pós-AHSCT ($FC > 2$, $p < 0.01$).	101
Figura 35. Volcano <i>plot</i> das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pós-AHSCT (D180) e MSCs controles, não diabéticas (CTRL). ..	108
Figura 36. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 pós-AHSCT e MSCs de indivíduos controles ($FC > 2$, $p < 0.01$).	109
Figura 37. Análise da sinalização de receptores acoplados à proteína G em células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes tipo 1 após o AHSCT.	117
Figura 38. Diagrama de Venn do número de sondas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre MSCs de pacientes diabéticos e MSCs controles antes e após o AHSCT.	118
Figura 39. Diagrama de Venn do número de sondas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre MSCs de pacientes diabéticos e MSCs controles antes e após o AHSCT.	121
Figura 40. Heatmap da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 pré, pós transplante e de indivíduos controles.	125
Figura 41. Dispersão espontânea das amostras dentre dois componentes principais (PCA) 2D, após normalização.	126
Figura 42. Volcano plot das sondas diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes com diabetes tipo 1 (T1D) e HSCs de indivíduos não diabéticos (CTRL).	128
Figura 43. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes com diabetes tipo 1 e HSCs de indivíduos controles ($FC > 2$, $p < 0.005$).	129
Figura 44. Heatmaps da expressão absoluta de Colágenos, Integrinas e Lamininas por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	130
Figura 45. Heatmap da expressão relativa de moléculas de adesão diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	132
Figura 46. Heatmaps da expressão de moléculas relacionadas à quimiotaxia por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	134
Figura 47. Heatmaps da expressão de peptidases (MMPs e ADAMs) por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	135

Figura 48. Heatmaps da expressão absoluta de citocinas e fatores de crescimento por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	137
Figura 49. Heatmaps da expressão absoluta de receptores de citocinas e fatores de crescimento por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.	140
Figura 50. Heatmap da expressão relativa de citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocinas e de fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.	142
Figura 51. Heatmap da expressão absoluta (a) e relativa (b) dos fatores de transcrição diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e de indivíduos controles.....	143

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-demográficas dos pacientes com T1D submetidos ao AHSCT	38
Tabela 2. Porcentagem de positividade para o marcador CD34 positivas em amostras de HSCs isoladas por coluna imunomagnética.....	50
Tabela 3. Listas das comparações realizadas.....	62
Tabela 4. Número de sondas diferencialmente expressas.....	63
Tabela 5. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	88
Tabela 6. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	89
Tabela 7. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	89
Tabela 8. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	90
Tabela 9. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	90
Tabela 10. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	91
Tabela 11. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	91
Tabela 12. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	92
Tabela 13. Componentes celulares enriquecidos em MSCs de pacientes com T1D.....	93
Tabela 14. Processos biológicos enriquecidos em MSCs de pacientes com T1D.....	94
Tabela 15. Funções moleculares enriquecidas em MSCs de pacientes com T1D.	95
Tabela 16. Vias canônicas enriquecidas em MSCs de pacientes com T1D.	96
Tabela 17. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	102
Tabela 18. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	102
Tabela 19. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	103
Tabela 20. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	103
Tabela 21. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	104
Tabela 22. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	104
Tabela 23. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	105
Tabela 24. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	105
Tabela 25. Componentes celulares enriquecidos após o AHSCT	106
Tabela 26. Processos biológicos enriquecidos após o AHSCT	106
Tabela 27. Funções moleculares enriquecidas após o AHSCT.....	106
Tabela 28. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas após o AHSCT	107
Tabela 29. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	110
Tabela 30. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	110

Tabela 31. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	111
Tabela 32. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	111
Tabela 33. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	112
Tabela 34. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	112
Tabela 35. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	113
Tabela 36. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	113
Tabela 37. Componentes celulares enriquecidos em MSCs de pacientes pós AHSCT.....	114
Tabela 38. Processos biológicos enriquecidos em MSCs de pacientes pós AHSCT.....	115
Tabela 39. Funções moleculares enriquecidas em MSCs de pacientes pós AHSCT	116
Tabela 40. Vias canônicas enriquecidas em MSCs de pacientes pós AHSCT	116
Tabela 41. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	119
Tabela 42. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	119
Tabela 43. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	120
Tabela 44. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	120
Tabela 45. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	122
Tabela 46. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas	122
Tabela 47. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	123
Tabela 48. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas	123
Tabela 49. Número de sondas diferencialmente expressas nas HSCs de pacientes com T1D.....	127
Tabela 50. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	145
Tabela 51. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas	146
Tabela 52. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	148
Tabela 53. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.....	149
Tabela 54. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas.	150
Tabela 55. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas.	151
Tabela 56. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	151
Tabela 57. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.....	152
Tabela 58. Componentes celulares enriquecidos em HSCs de pacientes com T1D.	153
Tabela 59. Processos biológicos enriquecidos em HSCs de pacientes com T1D.	154
Tabela 60. Funções moleculares enriquecidas em HSCs de pacientes com T1D.....	155
Tabela 61. Vias canônicas enriquecidas em HSCs de pacientes com T1D.....	155

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	15
1.2 Nicho hematopoético.....	27
1.3 As células estromais mesenquimais (MSCs)	28
1.4 MSCs e interações com o sistema imune.....	29
1.5 MSCs e HSCs de pacientes com doenças autoimunes	32
1.6 Hipótese do estudo	33
2. OBJETIVOS	35
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Pacientes e controles	37
3.2 Isolamento de células mononucleares da medula óssea.....	38
3.3 Separação imunomagnética das HSCs	38
3.4 Isolamento e cultura das MSCs.....	39
3.5 Imunofenotipagem das MSCs	39
3.6 Diferenciação das MSCs	40
3.7 Extração de RNA pelo método de Trizol.....	40
3.8 Purificação do RNA	41
3.9 <i>Microarrays</i> de oligonucleotídeos	41
3.10 Análises <i>in silico</i> dos resultados de expressão gênica.....	43
3.10.1 <i>Pré-processamento, normalização e estatística</i>	43
3.10.2 <i>Análise da expressão absoluta e diferencial de categorias pré-definidas</i>	43
3.10.3 <i>Análise DAVID</i>	44
3.10.4 <i>Gene set enrichment Analysis (GSEA)</i>	45
3.10.5 <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i>	45
3.10.6 <i>Diagrama de Venn</i>	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Caracterização das amostras pré- <i>microarray</i>	47
4.1.1 <i>Caracterização morfológica e imunofenotípica das MSCs</i>	47
4.1.2 <i>Análise da capacidade de diferenciação das MSCs</i>	49
4.1.3 <i>Análise da pureza das HSCs (CD34⁺)</i>	50

4.1.3 Extração do RNA	51
4.2 Hibridização das lâminas, pré-processamento e normalização dos dados	51
4.2.1 Padronização da plataforma Agilent Technologies.....	51
4.2.2 Hibridização das lâminas de microarray.....	51
4.2.3 Extração dos dados dos microarrays	52
4.2.4 Pré-processamento e normalização dos dados brutos.....	55
4.3 Análises <i>in silico</i> da expressão gênica global	59
4.3.1 Células estromais mesenquimais (MSCs).....	59
4.3.1.1 Agrupamento das amostras.....	59
4.3.1.2 Número de sondas diferencialmente expressas	61
4.3.1.3 Comparação dos grupos (T1D x CTRLs).....	63
4.3.1.3.1 Diferença do perfil de expressão gênica global.....	63
4.3.1.3.2 Análise da expressão de categorias pré-definidas	65
4.3.1.3.3 Análise DAVID	87
4.3.1.3.4 Gene set enrichment analysis (GSEA).....	92
4.3.1.3.5 Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	99
4.3.1.4 (D180 x T1D) Modulação da expressão gênica pelo AHSCT	100
4.3.1.4.1 Diferença do perfil de expressão gênica global.....	100
4.3.1.4.2 Análise DAVID	101
4.3.1.4.3 Gene set enrichment analysis (GSEA).....	105
4.3.1.5 (D180 x CTRLs) Fenótipo pós-transplante	107
4.3.1.5.1 Diferença do perfil de expressão gênica global.....	107
4.3.1.5.2 Análise DAVID	109
4.3.1.5.3 Gene set enrichment analysis (GSEA).....	113
4.3.1.5.4 Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	116
4.3.1.6 Caracterização das funções não moduladas pelo AHSCT.....	117
4.3.1.6.1 Sondas induzidas antes e após o AHSCT.....	118
4.3.1.6.2 Análise DAVID	118
4.3.1.6.3 Sondas reprimidas antes e após o AHSCT	121
4.3.1.6.4 Análise DAVID	122
4.3.1.7 Genes diferencialmente expressos das categorias pré-definidas após o AHSCT.....	123
4.3.2 Células tronco hematopoéticas (HSCs)	126
4.3.2.1 Agrupamento das amostras.....	126
4.3.2.2 Número de sondas diferencialmente expressas	126
4.3.2.3 Análise da expressão de categorias pré-definidas.....	129
4.3.2.4 Análise DAVID.....	144

4.3.2.5 <i>Gene set enrichment analysis (GSEA)</i>	152
5. CONCLUSÕES	158
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161
7. APÊNDICES E ANEXOS	180

RESUMO

DE LIMA, K.A. **Análise da expressão gênica global de células estromais mesenquimais e de células tronco hematopoéticas isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1**. 2012. 184f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (T1D) é uma doença autoimune mediada por células T e caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina. Células estromais mesenquimais (MSCs) e células tronco hematopoéticas (HSCs) são os principais componentes do nicho hematopoético na medula óssea. Estas células vêm sendo utilizadas nos últimos anos em transplantes autólogos para tratamento do T1D. O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica global de MSCs e HSCs de pacientes com T1D e compará-lo com células isoladas de indivíduos saudáveis através da técnica de *microarray* e programas específicos de bioinformática. As MSCs e HSCs foram isoladas da medula óssea de pacientes com T1D antes e após o tratamento com imunossupressão em altas doses seguida pelo transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (AHSCT). As MSCs apresentaram valor elevado de expressão absoluta de diversas moléculas potencialmente relacionadas com suas funções de suporte à hematopoese. MSCs de pacientes diabéticos apresentaram perfil de expressão gênica global distinto das isoladas de indivíduos saudáveis, com hiper-regulação da sinalização via proteína G e hiporregulação da atividade transcricional. O receptor β_3 adrenérgico, assim como a sinalização simpática, foram hiper-expressos nas células dos pacientes. Genes que codificam moléculas que suportam a hematopoese e regulados pelo sistema nervoso simpático, *VCAM1* e *CXCL12*, foram hiporregulados em nossa análise. Após o AHSCT, houve atenuação do perfil de expressão diferencial das MSCs dos pacientes, entretanto elas permaneceram com hiperatividade da sinalização via proteína G e déficit da atividade transcricional. As HSCs apresentaram altos níveis de expressão absoluta de diversas integrinas e receptores de citocinas e fatores de crescimento, potencialmente relacionados com funções na hematopoese. HSCs de pacientes com T1D apresentaram perfil de expressão gênica global distinto das de indivíduos saudáveis, com hiper-regulação de genes associados com a atividade transcricional. Os fatores de transcrição TCFL2 e p53, que têm papel fundamental na regulação do ciclo celular das HSCs, foram diferencialmente expressos entre as HSCs de pacientes diabéticos e controles. Assim, nossos resultados de expressão gênica global apontaram alterações intrínsecas nas HSCs e MSCs de pacientes

diabéticos que podem estar relacionadas com a falha terapêutica dos transplantes autólogos. A implicação dessas alterações no desenvolvimento e patogênese do T1D permanece desconhecida e a realização de ensaios funcionais poderá esclarecer o significado biológico das mesmas.

Palavras-chave: autoimunidade, células tronco mesenquimais, diabetes *mellitus* do tipo 1, células tronco hematopoéticas, transplante autólogo de células tronco hematopoéticas, expressão gênica, terapia celular.

ABSTRACT

DE LIMA, K.A. **Global gene expression analysis of mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cells isolated from bone marrow of type 1 diabetes patients.** 2012. 183f. School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Type 1 diabetes *mellitus* (T1D) is a T cell-mediated autoimmune disease, characterized by selective destruction of insulin-producing pancreatic β cells. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and hematopoietic stem cells (HSCs) are the main components of hematopoietic niches. In the last years, these cells are being used in autologous transplantation settings for T1D treatment. The main goal of this study was to evaluate the global gene expression profile of MSCs and HSCs from T1D patients, by using microarrays and bioinformatics specific programs. MSCs and HSCs were isolated from bone marrow of T1D patients before and after treatment with high dose immunosuppression followed by hematopoietic stem cell transplantation. MSCs showed high absolute expression values of several molecules potentially related to their function of hematopoiesis support. MSCs from T1D patients exhibited distinct gene expression profile from control MSCs and presented up-regulation of the G protein-coupled receptor signaling pathway and down-regulation of transcriptional activity. The $\beta 3$ adrenergic receptor, as well the sympathetic nervous system signaling were up-regulated on patient's cells. Genes that codify molecules which support hematopoiesis and are regulated by the sympathetic nervous system, *VCAM1* and *CXCL12*, were down-regulated on our analysis. After AHSCT, there was an attenuation of the differential expression profile of MSCs from T1D patients, however they remained with G protein-coupled receptor signaling pathway hyperactivity and transcriptional activity deficit. HSCs exhibited high absolute expression values of integrins, cytokine receptors and growth factors, molecules potentially related to hematopoietic functions. HSCs from T1D patients showed distinct expression profile from control HSCs and demonstrated up-regulation of genes related to transcriptional activity. The transcription factors *TCFL2* and *p53*, which have important role in regulating HSC cycle, were differentially expressed between HSCs from T1D patients and controls. Thus, our global gene expression analysis has revealed intrinsic alterations on MSCs and HSCs from T1D patients that could be related to the autologous transplant therapeutic failures. The implications of these alterations on the development and pathogenesis of T1D remain unknown and functional assays could unravel their biological meaning.

Keywords: autoimmunity, mesenchymal stem cells, type 1 diabetes *mellitus*, hematopoietic stem cells, autologous hematopoietic stem cells transplantation, gene expression, cell therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -MEM – do inglês “*minimum essential medium eagle- α* ”
- ADAM – do inglês “*a disintegrin-like and metalloprotease*”
- ADMATS – do inglês “*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motifs*”
- ADMSC – do inglês “*adipocyte mesenchymal stromal cell*” ou célula mesenquimal estromal do tecido adiposo
- AHSCT – do inglês “*autologous hematopoietic stem cells transplantation*” ou transplante autólogo de células tronco hematopoéticas
- AIRE – do inglês “*autoimmune regulator*” ou regulador autoimune
- APC – do inglês “*antigen presenting cell*” ou célula apresentadora de antígeno
- ATG – do inglês “*anti-thymocyte globulin*” ou globulina anti-timócito
- BM – do inglês “*bone marrow*” ou medula óssea
- CD – do inglês “*cluster of differentiation*” ou grupamento de diferenciação
- CFU-F – do inglês “*colony forming unit-fibroblast*” ou unidade formadora de colônia fibroblástica
- CTL – do inglês “*cytotoxic T lymphocyte*” ou linfócito T citotóxico
- CTLA-4 – do inglês “*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*” ou antígeno 4 de linfócito T citotóxico
- CTRL – grupo controle
- CXCL12 – do inglês “*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*”
- Cy3 – do inglês “*cyanine 3*” ou cianina 3
- D180 – grupo pós-transplante
- DAVID – do inglês “*database for annotation, visualization and integrated discovery*”
- DC – do inglês “*dendritic cells*” ou célula dendrítica
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – do inglês “*deoxyribonucleic acid*” ou ácido desoxirribonucleico
- D-POS – grupo pós-transplante
- D-PRE – grupo diabético pré-transplante
- ECM – do inglês “*extracellular matrix*” ou matriz extracelular
- EDTA – do inglês “*ethylenediamine tetraacetic acid*” ou ácido tetra-acético etilenodiamina

- EV – do inglês “*expression value*” ou valor de expressão
- FC – do inglês “*fold change*”
- FDR – do inglês “*false discovery rate*” ou taxa de falsa descoberta
- FITC – do inglês “*fluorescein isothiocyanate*” ou isotiocianato de fluoresceína
- FOXP3 – do inglês “*forkhead box P3*”
- G-CSF – do inglês “*Granulocyte colony-stimulating factor*”
- GSEA – do inglês “*gene set enrichment analysis*”
- HGF – do inglês “*hepatocyte growth factor*” ou fator de crescimento de hepatócito
- HLA – do inglês “*human leukocyte antigen*” ou antígeno leucocitário humano
- HSC – do inglês “*hematopoietic stem cells*” ou célula tronco hematopoética
- IAD – imunossupressão em altas doses
- ICAM-1 – do inglês “*intercellular Adhesion Molecule 1*” ou molécula 1 de adesão intercelular
- IDDM1 – do inglês “*insulin-dependent diabetes mellitus locus*” ou locus do diabetes *mellitus* insulino-dependente
- IDO – do inglês “*indoleamine 2,3-dioxygenase*” ou indoleamina 2,3 dioxigenase
- IFN – interferon
- IL – do inglês “*interleukin*” ou interleucina
- IPA – do inglês “*ingenuity pathway analysis*”
- IPEX – do inglês “*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*” ou síndrome da imunodesregulação, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X
- KDR – do inglês “*kinase insert domain receptor*”
- KEGG – do inglês “*kyoto encyclopedia of genes and genomes*”
- LFA-3 – do inglês “*lymphocyte function-associated antigen-3*” ou antígeno 3 associado à função do linfócito
- LIMMA – do inglês “*linear models for microarray data*”
- MHC – do inglês “*major histocompatibility complex*” ou complexo principal de histocompatibilidade
- MMP – do inglês “*matrix metalloproteases*” ou metaloproteases
- MSC – do inglês “*mesenchymal stromal cell*” ou célula mesenquimal estromal
- NK – do inglês “*natural killer*” ou assassina natural
- NKT – do inglês “*natural killer T*” ou assassina natural T
- NOD – do inglês “*non-obese diabetic*” ou diabético não-obeso
- PBS – do inglês “*phosphate buffered saline*” ou tampão fosfato-salina

- PCA – do inglês “*principal component analysis*” ou análise do componente principal
- PDX-1 – do inglês “*pancreas duodenum homeobox-1*”
- PE – do inglês “*phycoeritrin*” ou ficoeritrina
- PF4 – do inglês “*platelet factor 4*” ou fator 4 de plaqueta
- PG – do inglês “*prostaglandin*” ou prostaglandina
- PKA – do inglês “*protein kinase A*” ou proteína quinase A
- PTPN22 – do inglês “*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*”
- RNA – do inglês “*ribonucleic acid*” ou ácido ribonucleico
- ROS – do inglês “*reactive oxygen species*” ou espécies reativas de oxigênio
- SCF – do inglês “*stem cell factor*” ou fator de células tronco
- SCID – do inglês “*severe combined immunodeficiency*” ou imunodeficiência severa combinada
- T1D – do inglês “*type 1 diabetes*” ou diabetes tipo 1
- TACTH – transplante autólogo de células tronco hematopoéticas
- TGF – do inglês “*tumor growth factor*” ou fator de crescimento tumoral
- Th – do inglês “*T helper*” ou T auxiliar
- TMO – transplante de medula óssea
- TNF – do inglês “*tumor necrosis factor*” ou fator de necrose tumoral
- Treg – do inglês “*T regulatory*” ou T regulador
- VCAM-1 – do inglês “*vascular cell adhesion protein 1*” ou proteína 1 de adesão vascular
- VEGF – do inglês “*vascular and endothelial growth factor*”

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes mellitus do tipo 1*

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (*type 1 diabetes*, T1D) é uma doença metabólica causada pelo ataque autoimune contra as células β pancreáticas produtoras de insulina. É considerada uma doença crônica grave que se manifesta em cerca de 90% dos casos na infância. Recentemente, tem se verificado um aumento na incidência do T1D em nível mundial, cerca de 2-5% por ano, com acometimento de crianças cada vez mais jovens. Existem entre 10 e 20 milhões de pessoas com diabetes tipo 1 no mundo, fato que representa um grande impacto referente à gastos com intervenção médica necessária no tratamento (1).

A definição clínica do T1D é baseada nos níveis elevados de glicose sanguínea, entretanto, esse evento não está diretamente relacionado com o início da resposta autoimune, mas com a destruição da maioria das células β pancreáticas, que culmina na insuficiência da produção do hormônio insulina. A insuficiência desse hormônio resulta num estado de hiperglicemia como consequência do aumento da produção hepática de glicose e diminuição de sua captura da circulação. Na ausência de insulina, também ocorre intensa quebra e oxidação de ácidos graxos, relacionados com a excessiva produção de cetonas. Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam progressivamente à depressão do sistema nervoso central, problemas cardiovasculares, insuficiência renal, cegueira, úlceras crônicas, coma e podem resultar em morte (revisado por (2)).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da doença ainda não estão completamente esclarecidos, entretanto trabalhos demonstram uma forte influência de fatores genéticos. Diversos trabalhos observaram diferença no perfil de expressão gênica global de amostras provenientes de pacientes e modelos animais com diabetes autoimune quando comparadas com amostras controles, dentre elas, células mononucleares do sangue periférico (3, 4), sangue periférico total (5), monócitos (6-8), linfonodos, baço e pâncreas (revisado por (9)). Dentre os genes associados, 50% deles está presente na região cromossômica 6p21, denominada IDDM1 (*insulin-dependent diabetes mellitus locus*), que codifica moléculas do HLA. Existe ainda, forte associação com genes codificadores da insulina e moléculas relacionadas com a regulação do sistema imune, como PTPN22, CTLA-4, IL2RA, FOXP3 e AIRE (revisado por (10, 11)). Muitos desses genes codificam

moléculas com funções importantes em células T, o que as colocam no centro da patogênese do T1D (revisado por (12, 13)).

Muito do conhecimento atual deve-se à estudos em modelos experimentais de diabetes autoimune, genéticos ou induzidos, que assemelham-se ao diabetes tipo 1 em humanos. Tais modelos forneceram observações importantes a respeito do envolvimento de diversas outras células do sistema imune na destruição autoimune que acontece na doença. Além das células T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, células B, NK (*Natural Killer*), NKT, macrófagos e subtipos de células dendríticas (DCs) são frequentemente encontrados no infiltrado pancreático e linfonodos drenantes (14-20).

O estágio precoce do T1D é caracterizado por insulite, devida à infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares (21). Dentre essas, macrófagos e células dendríticas são as principais efetoras (22). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o efeito deletério dos macrófagos é mediado pela produção do TNF (*Tumor Necrosis Factor*), IL-1 β (Interleucina-1 β) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (23, 24). Ainda, eles são responsáveis pela produção de IL-12 (25), importante na ativação e diferenciação das células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) no início da resposta autoimune (26). As DCs, por sua vez, são importantes na captura e apresentação de autoantígenos nos linfonodos drenantes para células T (14, 15). Interessantemente, DCs de camundongos NOD (*non-obese diabetic*), o principal modelo experimental de diabetes autoimune, são mais eficientes na ativação das células T, pois produzem altas concentrações de IL-12 e apresentam maior expressão de moléculas coestimulatórias (27, 28).

Modelos animais indicam que as células Th1 secretoras de IFN- γ desempenham papel central no T1D, principalmente na ativação das CTLs. As células Th17 têm sido amplamente associadas com respostas inflamatórias crônicas e doenças autoimunes, algumas anteriormente descritas como padrão Th1, caso da esclerose múltipla e artrite reumatóide (29). Em camundongos NOD (*non-obese diabetic*), foi descrito que a inibição das células Th17 regula a autoimunidade (30, 31). Por outro lado, células T reguladoras (Tregs), protegem contra o desenvolvimento do diabetes. Pacientes portadores da síndrome IPEX (imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X), uma mutação no fator de transcrição chave da diferenciação das células T reguladoras, o FOXP3, podem desenvolver T1D (32). Além disso, NODs deficientes em Tregs desenvolvem a doença de forma mais acelerada (33).

São vários os mecanismos sugeridos pelos quais as células T promovem a morte das células β pancreáticas. Os CTLs podem matá-las diretamente, através da citotoxicidade

celular, mediada pelo reconhecimento do MHC de classe I expresso nas células β . Ambas, células $CD4^+$ e $CD8^+$ produzem citocinas que induzem a expressão de Fas (CD95) e produção de quimiocinas pelas células β . Células T ativadas que expressam FasL induzem, diretamente, apoptose em células β . A produção de quimiocinas inicia um círculo vicioso, com recrutamento de mais células mononucleares e consequente inflamação (34). Além da ação direta em células β , o IFN- γ induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF) por macrófagos. Em sinergismo, essas citocinas potencializam a produção de ROS por macrófagos ativados, assim como a apoptose das células β , produtoras de insulina.

As células B atuam como APCs (*Antigen Presenting Cells*) das células T autorreativas (18). A depleção de células B em camundongos NOD, antes do início da doença diminui a insulite e previne o desenvolvimento do diabetes em cerca de 60% dos animais. Entretanto, depleção após o início da doença apenas retarda a progressão do T1D e não possui caráter curativo, o que apenas sugere atenuação da ativação das células T autorreativas (35). Brodie e colaboradores mostraram que a deficiência de linfócitos B correlaciona com a diminuição da sobrevivência das CTLs infiltrantes e atraso no desenvolvimento do diabetes. Eles sugeriram que essa menor sobrevida pode ser devida a falta de ativação e produção insuficiente de citocinas por células T $CD4^+$ (36).

O T1D é convencionalmente tratado por injeções diárias de insulina, aplicadas de acordo com os níveis de glicemia e a quantidade de carboidratos da dieta. Devido ao incômodo e complexidade, muitas vezes o método não é rigorosamente seguido pelos pacientes. Ainda, têm sido demonstrados casos de resistência à terapia (37-40).

De forma geral, os resultados obtidos são satisfatórios e os pacientes levam uma vida normal, entretanto, a gênese da doença não é controlada, a resposta autoimune agressora permanece e impede a regeneração endógena das células produtoras de insulina. Dessa forma, o tratamento não é considerado curativo e os indivíduos devem tomar insulina pelo resto da vida. Com essa perspectiva, novas abordagens terapêuticas que restaurem a autotolerância ou preservem direta ou indiretamente a produção endógena de insulina passaram a ser o principal foco de novas terapias.

Dentre as alternativas terapêuticas encontra-se a imunossupressão, que controla a resposta autoimune. De ação inespecífica e sistêmica, os principais agentes terapêuticos desse grupo são a ciclosporina A, azatioprina e prednisona. Entretanto, a resposta benéfica ocorre somente durante o tratamento, sendo ineficaz na restauração da autotolerância. Além disso, o quadro de imunossupressão e a citotoxicidade observada durante o uso limita muito a indicação desses agentes para o tratamento de T1D (41-43).

Para contornar essas desvantagens, novas imunoterapias que visam à inibição específica de células que participam diretamente do processo patogênico da doença, tais como células T e B, têm sido utilizadas. Em modelos de diabetes experimental, o tratamento inicial com anticorpos anti-CD3, para depleção de células T, é eficaz e induz tolerância imunológica (44-46). Até o momento, diversos ensaios clínicos com anti-CD3 para o tratamento de T1D em humanos estão em andamento, entretanto, os resultados são desanimadores (47). A depleção das células B com rituximab (anti-CD20) também não é satisfatória, com discreta melhora somente nos dois primeiros anos de tratamento (48, 49).

Enquanto o diabetes experimental é facilmente revertido por diversas abordagens terapêuticas, a melhora clínica em humanos é parcial, transiente ou inexistente. Dentre todas as novas intervenções, certamente, a de melhor resultado foi a terapia de imunossupressão em altas doses seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (IAD/TACTH; nesse trabalho, frequentemente simplificado como AHSCT, *autologous hematopoietic stem cells transplantation*), amplamente utilizada no tratamento de diversas outras doenças autoimunes e inflamatórias (50-52).

Em 2003, nosso grupo liderado pelo Prof. Dr. Júlio César Voltarelli, iniciou um estudo clínico pioneiro de fase I/II no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Vinte e três pacientes com T1D recém-diagnosticados foram recrutados e submetidos à imunossupressão em altas doses (ciclofosfamida e ATG) seguida pelo TACTH. Após um seguimento médio de 30 meses, 20 dos 23 pacientes permaneceram livres de insulina por algum período. Para doze (12/20) pacientes, a insulina foi dispensável por pelo menos 31 meses. Os oito (8/20) restantes recaíram e voltaram a usar insulina, entretanto em menores quantidades do que no período pré-transplante (53, 54). Recentemente, um grupo polonês utilizou protocolos similares e demonstrou que 7 de 8 pacientes submetidos ao TACTH tornaram-se independentes da administração exógena de insulina (55).

Apesar dos mecanismos de ação da terapia de IAD/TACTH em doenças autoimunes não terem sido completamente elucidados, existem algumas hipóteses. A terapia pode impedir novos ataques autoimunes através da eliminação do sistema imune patogênico do paciente (células T e B autorreativas). Além dessa imunossupressão não específica, foi sugerido que o transplante reestabeleça a tolerância imunológica nos pacientes, evidenciada pelo aumento do número de células T reguladoras (56) e reativação tímica pós-transplante, com a formação de um novo repertório de células T (57, 58). Nesse cenário, a massa β pancreática residual poderia sobreviver, o processo de regeneração endógeno seria preservado e ocorreria novamente secreção de insulina para a manutenção da glicemia dentro dos níveis normais (59).

Os resultados iniciais com a utilização de TACTH para o tratamento de T1D foram encorajadores. No entanto, atualmente, dos 25 pacientes transplantados (dados em preparação para publicação), apenas quatro não apresentaram recaída clínica, voltando a depender de insulina. Dessa forma, é evidente que o efeito benéfico do tratamento é transitório e pode estar correlacionado com a resistência de clones autorreativos ao regime imunossupressor, defeitos intrínsecos das HSCs autólogas transplantadas, assim como defeitos dos componentes envolvidos nos microambientes (nichos) de desenvolvimento e maturação das HSCs e células do sistema imune, caso da medula óssea e timo.

Após o transplante, as HSCs são rapidamente recrutadas para a medula óssea. No microambiente medular, conhecido como nicho hematopoético, elas recebem sinais provenientes das células estromais e iniciam o programa de repopulação de um novo sistema imune. Atualmente, os mecanismos envolvidos nesses eventos não estão completamente compreendidos, entretanto estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram informações importantes a respeito de moléculas, vias de sinalização e de células que participam ativamente do processo de hematopoese. Tais eventos podem ter influência direta na resposta clínica observada em pacientes submetidos a IAD/TACTH.

1.2 Nicho hematopoético

Dados recentes sugerem que as HSCs encontram-se em plena movimentação, transitando frequentemente entre periferia e a medula óssea (revisado por (60)).

Na medula óssea, as HSCs localizam-se, basicamente, em dois nichos hematopoéticos. Basicamente, precursores hematopoéticos menos comprometidos, com potencial de autorrenovação, encontram-se próximos da superfície óssea, no nicho conhecido como endostal ou osteoblástico. Essas células apresentam fenótipo quiescente/dormente, encontram-se no estado G_0 do ciclo celular e raramente entram em divisão celular. Sob determinados estímulos, tornam-se ativadas e passam para um segundo estado de maturação, conhecido como “homeostático”. HSCs homeostáticas possuem multipotencial de diferenciação, entretanto, perdem a capacidade de autorrenovação. Possuem maquinaria de replicação ativada, baixo metabolismo e entram em divisão celular com maior frequência. Além do mais, são responsáveis pela produção fisiológica de todas as células hematopoéticas. Quanto à localização, encontram-se mais distantes do nicho osteoblástico, próximas aos sinusóides, no segundo nicho descrito, denominado vascular ou endotelial (revisado por (61)).

O balanço entre autorrenovação e diferenciação das HSCs é regulado por diversos moléculas e fatores. Embora a maioria das HSCs encontradas esteja em estado quiescente, em determinadas ocasiões, sinais provenientes dos componentes do nicho sinalizam e ativam o ciclo celular dessas células. Dentre as principais vias, está a sinalização via receptores Notch e Wnt (*Wingless*), assim como o eixo CXCR4/CXCL12 (revisado por (62, 63)).

A interação de CXCL12 com CXCR4 é essencial para o desenvolvimento de células B, colonização da medula óssea por progenitores hematopoéticos e manutenção da sobrevivência e estado quiescente das HSCs (64-66). O bloqueio seletivo de CXCR4 aumenta a concentração de HSCs no sangue periférico, que sugere importante papel de CXCL12 na retenção desses progenitores na medula óssea (67, 68).

Importante fonte desses fatores de manutenção é encontrada ao redor das células endoteliais, as células estromais mesenquimais (MSCs), fornecem suporte estrutural e interagem fisicamente com as HSCs (revisado por (69-73)). *In vivo*, são caracterizadas pela expressão do CD146 em humanos (74) e do marcador de progenitores neurais, a nestina, em camundongos (75).

Adicionalmente ao papel de suporte, MSCs nestina⁺ são capazes de formar unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) e diferenciarem-se em outras células de origem mesodérmica, como adipócitos, condrócitos e osteoblastos (75), propriedade anteriormente atribuída às células tronco mesenquimais. MSCs nestina⁺ são consideradas atualmente as células tronco mesenquimais encontradas *in vivo*, extensivamente estudadas e com diversas funções imunorreguladoras descritas no contexto hematopoético (76).

1.3 As células estromais mesenquimais (MSCs)

As MSCs foram descritas há mais de 45 anos por Friedenstein e colaboradores (77). Através do cultivo de células da medula óssea, eles isolaram uma população de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e que possuía a capacidade de formar colônias *in vitro*, as quais os autores denominaram de unidades formadoras de colônias fibroblastóides. Com o mesmo protocolo, Owen nomeou essa população celular de célula estromal mesenquimal (78) e, na década de 90, devido ao seu possível potencial de diferenciação em células da linhagem mesodérmica, Caplan cunhou o nome que se tornou amplamente popular: células tronco mesenquimais (79).

A partir de então, esse protocolo de isolamento passou a ser extensivamente utilizado e tornou-se evidente que essa população constituía células estromais heterogêneas, com

distintos potenciais de diferenciação. Em 2005, durante reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular, foi proposta uma nova nomenclatura e o termo células estromais mesenquimais multipotentes foi introduzido para referir-se à população de células aderentes ao plástico, de morfologia fibroblastóide e capacidade multipotencial de diferenciação (80).

As MSCs são de fácil isolamento, expansão e cultivo. Em cultura, caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de linhagens hematopoéticas tais como CD34, CD45, CD14, glicoforina A e pela porcentagem média/alta de células positivas para CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD54, CD90, CD49e, CD73, CD105, CD166, CD271, CD140b, STRO e KDR, bem como algumas moléculas de adesão essenciais envolvidas na interação com células T, como VCAM-1, ICAM-1, e LFA-3 (revisado por (81)). Na ausência de ativação, elas expressam MHC de classe I, não expressam MHC de classe II, moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e apresentam fenótipo hipoinmunogênico (Le Blanc e Ringden, 2005). Desse modo, é sugerido que as MSCs escapam da vigilância imunológica e podem ser transplantadas de forma autóloga, alogênica e até mesmo xenogênica.

Isso tem sido demonstrado experimentalmente pela infusão de MSCs humanas em modelos animais imunocompetentes, sem rejeição das mesmas, com bons resultados terapêuticos (82-84). Desta forma, estes estudos experimentais fundamentaram a aplicação terapêutica de MSCs alogênicas/xenogênicas em terapias celulares.

Embora não expressem MHC de classe II e sejam consideradas hipoinmunogênicas em condições homeostáticas, mediante a certos estímulos, MSCs adquirem propriedades de células apresentadoras de antígenos (85-88). Essa alteração é modulada por citocinas pró-inflamatórias, com indispensável papel do IFN- γ . Em baixas concentrações, ele induz fenótipo pró-inflamatório em MSCs. Por outro lado, altos níveis de IFN- γ resulta no chamado processo de licenciamento, mecanismo pelo qual as MSCs ativam suas propriedades imunorreguladoras (89-96).

Com base nas suas propriedades imunológicas, imunorreguladoras e regenerativas que serão descritas no próximo tópico, MSCs alogênicas poderiam ser aplicadas terapêuticamente na indução de tolerância imunológica em transplantes para tratamento de doenças autoimunes humanas com ausência de imunossupressão concomitante.

1.4 MSCs e interações com o sistema imune

Recentemente empregadas em ensaios clínicos, as MSCs apresentam diversas propriedades imunossupressoras e imunorreguladoras, demonstradas tanto *in vitro* quanto

in vivo. Possuem a capacidade de modular a função de várias populações celulares do sistema imune (revisado por (97-99)).

Dentre os trabalhos pioneiros a respeito do efeito imunorregulador das MSCs, Di Nicola e colaboradores demonstraram a supressão de células T humanas estimuladas pela adição de linfócitos alogênicos irradiados, células dendríticas ou por fito-hemaglutinina (mitógeno) (100). Um ano mais tarde, Le Blanc *et al.*, reproduziram os achados e demonstraram que o efeito das MSCs era dose-dependente (Le Blanc *et al.*, 2003).

Além de atuarem sobre linfócitos T, MSCs interferem na diferenciação, maturação e função de células dendríticas (101-103) e induzem células T reguladoras (104, 105). As MSCs também regulam a atividade de células NK (106) e de células B (107).

Os mecanismos responsáveis por esses efeitos são diversos e permanecem contrastantes na literatura. Em geral, são dependentes do contato célula-célula e da produção de fatores solúveis. Algumas moléculas são frequentemente descritas, tais como a enzima IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), o óxido nítrico (dependente de contato), o TGF- β , a IL-10, o HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) e a prostaglandina E2 (PGE2) (revisado por (108)).

As MSCs também expressam uma diversidade de receptores de quimiocinas e quimiocinas e, dessa forma, são capazes de migrar para sítios inflamatórios após administração intravenosa, o que aumenta sua aplicação no tratamento de doenças inflamatórias. As MSCs podem ser utilizadas na medicina regenerativa e engenharia de tecidos, pois são multipotenciais. Além do mais, secretam um grande número de moléculas bioativas (citocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos) que auxiliam o reparo/regeneração de regiões injuriadas (108).

Devido a todas essas características, as MSCs têm sido utilizadas nos últimos anos para tratamento de várias doenças autoimunes e inflamatórias, dentre elas o T1D. Com base nos resultados pré-clínicos, discutidos abaixo, existem, atualmente, em torno de 10 ensaios clínicos cadastrados no *ClinicalTrials.gov* do *National Institutes of Health* dos Estados Unidos, que visam a utilização das MSCs com suas propriedades imunossupressora, imunorreguladora e regenerativa para o tratamento de pacientes com T1D.

Em 2006, Lee e colaboradores mostraram que células mesenquimais humanas (hMSCs) migram e promovem reparo tecidual do pâncreas e glomérulos renais de

camundongos NOD/SCID diabéticos. Após tratamento, a glicose sanguínea dos camundongos foi normalizada e a concentração de insulina periférica aumentou (109).

Em 2008, Zhao e colaboradores mostraram que o transplante de células estromais derivadas da medula óssea de camundongos ICR, que expressam TGF- β , foi capaz de reverter o diabetes em camundongos NOD, por meio da modulação das subpopulações de células T CD4⁺. Os pesquisadores demonstraram ainda que as MSCs foram capazes aumentar a frequência de células T reguladoras e diminuir a frequência das células Th17 (110).

Boumaza e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com MSCs autólogas, derivadas de medula óssea, levou ao aumento da expressão de insulina e PDX-1 (*Pancreas Duodenum Homeobox-1*, gene essencial para o desenvolvimento do pâncreas e produção de insulina) nas ilhotas pancreáticas. Além disso, eles observaram aumento periférico da frequência de células T reguladoras (111). Em outro estudo, MSCs isoladas de camundongos BALB/c foram capazes de reduzir a infiltração de células T diabetogênicas nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD e migraram para os linfonodos pancreáticos, onde promoveram a indução de células T reguladoras Foxp3⁺ produtoras de IL-10 (112).

Recentemente, o grupo liderado pelo Prof. Dr. Niels Olsen Câmara, demonstrou que células mesenquimais isoladas do tecido adiposo (ADMSCs) de camundongos BALB/c foram capazes de reverter o quadro hiperglicêmico de camundongos NOD recém-diabéticos. Após o tratamento, houve uma diminuição da resposta Th1 e concomitante expansão/proliferação de células T reguladoras naturais, que resultaram na manutenção funcional das células β pancreáticas (105).

Na grande maioria dos estudos utilizando MSCs no tratamento de doenças autoimunes, o efeito terapêutico das MSCs não parece estar associado com sua transdiferenciação em células residentes que foram danificadas (no caso do diabetes, células β pancreáticas), mas com suas propriedades imunossupressora, anti-inflamatória e regenerativa, interrompendo a reposta autoimune agressora e estimulando a sobrevivência e proliferação de células progenitoras residentes/endógenas através da produção de citocinas e fatores de crescimento solúveis (113).

Em 2009, Fiorina e colaboradores publicaram um trabalho muito interessante que corrobora com a hipótese apresentada no presente trabalho. Eles demonstraram que MSCs isoladas da medula óssea de camundongos não diabéticos, BALB/c, foram capazes de retardar o desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD pré-diabéticos e de reverter

temporariamente a hiperglicemia em 90% dos camundongos já diabéticos. Entretanto, quando utilizaram MSCs autólogas, de camundongos NOD, estas foram incapazes de reproduzir tais efeitos. Além disso, MSCs de camundongos NOD apresentaram uma menor capacidade de migração para os linfonodos pancreáticos em relação às MSCs dos BALB/c controles (114). Esses resultados sugerem que MSCs isoladas de camundongos com doenças autoimunes podem apresentar alterações intrínsecas, que afetariam suas propriedades imunossupressora e imunorreguladora, corroborando a hipótese e resultados desse presente trabalho.

1.5 MSCs e HSCs de pacientes com doenças autoimunes

Devido ao grande potencial terapêutico, estudos de caracterização das MSCs autólogas de pacientes com doenças autoimunes têm se tornado de extrema importância, principalmente após o surgimento de evidências de que MSCs alogênicas podem não ser “imunoprivilegiadas”, como anteriormente consideradas (115).

Apesar de escassos, alguns trabalhos avaliaram características biológicas de MSCs isoladas de indivíduos com doenças autoimunes, caso da doença de Crohn (116), artrite reumatóide (117), esclerose sistêmica (118, 119), esclerose múltipla (120, 121) e lúpus eritematoso sistêmico (122, 123). No entanto, não existem trabalhos demonstrando se as MSCs de pacientes com T1D são normais ou têm alterações intrínsecas/funcionais.

Em 2008, Kastrinaki e colaboradores avaliaram o perfil de expressão gênica global de MSCs de pacientes com artrite reumatoide. Dentre as diferenças observadas, genes envolvidos especialmente em processos de adesão celular e síntese de matriz extracelular (117). Esse é o único estudo publicado que utilizou análise da expressão gênica global para comparar MSCs de pacientes com células saudáveis.

Apesar da grande utilização em transplantes autólogos, HSCs de pacientes com doenças autoimunes raramente são avaliadas e pouco se sabe a respeito de suas propriedades biológicas. Em alguns modelos experimentais, o transplante de progenitores hematopoéticos provenientes de animais com doença autoimune induz doença em animais saudáveis, que sugere defeito intrínseco dessas células (124-126). No entanto, nesses casos, a transferência inevitada de um único clone autorreativo pode ter sido a responsável por esse fenótipo observado.

No ano passado, em trabalho controverso, Lutterotti e cols. realizaram *microarray* de HSCs de pacientes com esclerose múltipla e observaram que elas não apresentavam fenótipo pró-inflamatório e não possuíam diferenças significativas quando comparadas com

células de indivíduos saudáveis (127). Num elegante trabalho, Kalscheuer e colaboradores reconstituíram camundongos imunodeficientes com HSCs (CD34⁺) isoladas da medula óssea de pacientes com T1D. Após avaliação do novo repertório de células do sistema imune, os autores constataram que HSCs de pacientes diabéticos geraram Tregs naturais em número similar ao de HSCs saudáveis. Contudo, houve uma maior proporção periférica de células T ativadas e de memória derivadas das HSCs dos pacientes com T1D. Eles sugeriram que essa diferença pode ter sido ocasionada por um defeito intrínseco das HSCs, que pode estar relacionado com a patogênese do T1D (128). No entanto, não existem evidências conclusivas a respeito das propriedades genéticas, biológicas e funcionais das HSCs de pacientes com T1D.

1.6 Hipótese do estudo

Posto que as MSCs e HSCs já estejam sendo utilizadas há alguns anos em transplantes autólogos em pacientes com T1D, não existem evidências se essas células são normais ou apresentam alterações intrínsecas que possam exercer um papel importante na falha terapêutica desses transplantes e/ou na patogênese dessa doença.

Desse modo, nossa hipótese é a de que, se as HSCs são responsáveis pela formação de todo o sistema linfo-hematopoético, elas podem ter influência direta na geração dos clones de células T e B autorreativos e outras células envolvidas no desenvolvimento da autoimunidade nos pacientes com T1D. Assim, os pacientes com T1D submetidos à terapia de IAD/TACTH podem simplesmente sofrer uma modulação transitória da doença, consequente da imunossupressão intensa a qual são submetidos. Após esse período, a reconstituição do novo sistema imune “diabético”, derivado das HSCs autólogas com alterações intrínsecas, pode estar relacionada à recaída clínica observadas nos pacientes. A mesma hipótese é válida para os outros componentes do nicho hematopoético. As MSCs, se tratando do principal subtipo celular de suporte à hematopoese, pode estar relacionada desenvolvimento da autoimunidade e patogênese do T1D. Paralelamente, defeitos intrínsecos dessas células poderiam afetar suas propriedades imunorreguladoras e impactar diretamente em sua eficácia terapêutica após transplante autólogo em pacientes com T1D.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral avaliar o perfil de expressão gênica global de células estromais mesenquimais (MSCs) e de células tronco hematopoéticas (HSCs) isoladas da medula óssea de pacientes com *diabetes mellitus* do tipo 1 (T1D).

Constituem os objetivos específicos:

1. Isolar células tronco hematopoéticas CD34⁺ da medula óssea de pacientes com T1D e de indivíduos controles saudáveis através de colunas imunomagnéticas e caracterizá-las por imunofenotipagem;
2. Isolar e expandir células estromais mesenquimais da medula óssea de pacientes com T1D e de indivíduos controles saudáveis e caracterizá-las quanto a morfologia, imunofenótipo e capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*;
3. Analisar a expressão absoluta de genes relacionados às principais funções descritas das MSCs e HSCs;
4. Avaliar o perfil de expressão gênica global por microarrays de MSCs isoladas da medula óssea de pacientes com T1D e indivíduos controles saudáveis;
5. Avaliar o efeito da terapia de imunossupressão em altas doses seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas sobre a expressão gênica global de MSCs de pacientes com T1D, ao comparar a expressão gênica diferencial das células isoladas pré e pós-transplante;
6. Avaliar o perfil de expressão gênica global por microarrays de HSCs isoladas da medula óssea de pacientes com T1D e indivíduos controles saudáveis;
7. Realizar análises *in silico* através de programas de bioinformática de processos biológicos significativos e vias de sinalizações nas MSCs e HSCs de pacientes com T1D e de indivíduos controles saudáveis.

CASUÍSTICA, MATERIAL E **MÉTODOS**

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e controles

Foram estudados nesse trabalho pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 (T1D), submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (IAD/TACTH), na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). O protocolo de transplante específico para o T1D foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Proc. 10095/02) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (RG 7160) (Apêndices e Anexos). Nesses protocolos, estão definidos os critérios de seleção dos pacientes. Foram colhidas amostras de medula óssea dos pacientes com T1D antes (n=21; pré-mobilização, aqui referido como “T1D”, “D-PRE”, “pré-transplante”, “pré-AHSCT”) e 180 dias após o transplante (n=19, aqui referido como “D180”, “D-POS”, “pós-transplante”, “pós-AHSCT”) para isolamento das HSCs CD34⁺ e MSCs. A Tabela 1 apresenta as características clínico-demográficas dos pacientes com T1D submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida pelo AHSCT, cujas amostras foram analisadas nesse trabalho. As amostras foram colhidas de pacientes diabéticos transplantados na Unidade de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP no período de maio/2004 a agosto/2008. Amostras de medula óssea de indivíduos não diabéticos, saudáveis (doadores voluntários de medula óssea; n=13, aqui referido como “CTRL”, “controles”) também foram colhidas para isolamento das células. MSCs foram isoladas, expandidas, quantificadas quanto à formação de CFU-F, imunofenotipadas e diferenciadas em adipócitos e osteoblastos. MSCs e HSCs foram utilizadas para análise de expressão gênica global.

Tabela 1. Características clínico-demográficas dos pacientes com T1D submetidos ao AH SCT

Paciente	Sexo/ idade (anos)	Anticorpo anti-GAD65 (U/mL)	Glicemia (mg/dL)	Dose de insulina (U/kg/dia)	Uso de insulina durante primeiros 6 meses pós-transplante	Tipo celular da MO analisado
(DM1) WSL	M/21	1,1	381	0,39	Não	MSC
(DM2) MGB	M/15	22	321	0,36	Não	MSC/HSC
(DM5) TAS	F/20	4	391	0,48	Sim	HSC
(DM6) RAOA	M/16	48	314	0,35	Não	HSC
(DM7) PMR	F/18	102	330	0,42	Não	MSC
(DM13) LTF	M/16	21,1	291	0,66	Não	MSC
(DM17) MQS	F/16	1,1	439	0,34	Sim	HSC

Níveis séricos de anticorpos anti-GAD foram dosados por radioimunoensaio usando kits comerciais (R.S.R. Limited, Cardiff, UK), laboratórios do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Resultados foram considerados positivos se > 1U/ml. MO= medula óssea.

3.2 Isolamento de células mononucleares da medula óssea

Amostras de 3-5 mL de medula óssea dos doadores controles e de pacientes com T1D nos períodos pré e D180 (dia +180) pós-transplante foram colhidas na presença de EDTA e separadas por centrifugação em gradiente de densidade (129) (Ficoll-Hypaque™ d = 1,077, Amersham Biosciences, USA). As amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato contendo anticoagulante (PBS-ACD), aplicadas cuidadosamente sobre o Ficoll-Hypaque e centrifugadas a 500g por 30 minutos a temperatura ambiente para obtenção da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase plasma-Ficoll-Hypaque foram cuidadosamente coletadas, lavadas duas vezes com PBS-ACD, ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 10% soro fetal bovino e, contadas em câmara de Neubauer.

3.3 Separação imunomagnética das HSCs

Após a separação das células mononucleares por gradiente de densidade, as HSCs CD34⁺ foram isoladas por coluna imunomagnética utilizando um kit comercial (*CD34 Progenitor Cell Isolation kit*, Miltenyi Biotec). A uma suspensão celular de até 3x10⁸ células/300 µL de PBS-EB (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% soro albumina humana) foram adicionados 100 µL de *FcR Blocking Reagent* e 100 µL de *Hapten-Antibody*. As células foram incubadas por 15 minutos a 4°C e em seguida lavadas com PBS-EB gelado. Posteriormente, foram ressuspensas em 400 µL de PBS-EB e incubadas com 100 µL de *Anti-hapten Microbeads* por 15 minutos a

4°C para então serem lavadas com PBS-EB gelado e, finalmente, ressuspensas nesse tampão. A suspensão celular foi então adicionada na coluna separadora presa a um campo magnético. As HSCs foram isoladas por seleção positiva, na qual as células CD34⁺ magneticamente marcadas ficam retidas na coluna enquanto as não marcadas passam por ela. Em seguida, a coluna foi lavada com PBS-EB, removida do campo magnético e as células CD34⁺ marcadas eluídas com PBS-EB. Uma amostra das células CD34⁺ obtidas foi analisada por citometria de fluxo para análise da porcentagem de pureza, e ao restante das células foi adicionado solução de TRIzol (GIBCO BRL Life Technologies, USA). Essas amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração de RNA. Para os experimentos de *microarrays* foram utilizadas amostras com pureza $\geq 90\%$ de células CD34⁺.

3.4 Isolamento e cultura das MSCs

Para o isolamento das MSCs, $1-4 \times 10^7$ de células mononucleares isoladas por gradiente de densidade foram suspensas em meio de cultura α -MEM com 15% de soro bovino fetal, plaqueadas em garrafa de 75 cm² e cultivadas a 37°C com 5% de CO₂. Após três dias, as células não aderentes foram removidas e foi adicionado 20 mL de meio de cultura α -MEM. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e quando as células estavam semiconfluentes, foram tripsinizadas (tripsina 1%) e repicadas em outras garrafas (primeira passagem). Na terceira passagem, alíquotas de MSCs foram congeladas em soro fetal bovino e 10% DMSO para estocagem em nitrogênio líquido. Essas células foram posteriormente utilizadas para caracterização imunofenotípica, multipotencial e congelamento em TRIzol.

3.5 Imunofenotipagem das MSCs

Alíquotas de 100 μ L de uma suspensão com $0,1 \times 10^6$ MSCs/mL foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro com 5 μ L de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos, isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Foram feitas marcações simples ou duplas para a análise dos diversos marcadores. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 500g, lavadas 2 vezes com tampão PBS 1X, ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas no citômetro de fluxo FACSsort (Becton-Dickson). Foram adquiridos 20000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). As análises foram realizadas com o uso do software Cellquest (BD). Foram utilizados anticorpos monoclonais contra os seguintes marcadores de superfície: CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD14, CD54,

CD90, CD49e, CD34, CD73, CD105, CD140b, CD271, CD146, CD166, HLA ABC, HLA DR, STRO, KDR, HLA-G.

3.6 Diferenciação das MSCs

Na terceira passagem, as MSCs foram induzidas a diferenciação em adipócitos e osteoblastos pelo cultivo em meios específicos. Alíquotas de 1 mL contendo 40.000 células/mL e 5.000 células/mL (controle) foram plaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo, quando as células estavam em torno de 50% confluentes. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e foi adicionado 1 mL do meio de indução específico (adipogênico ou osteogênico) ou somente α -MEM 7,5% SFB como controle. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado duas vezes por semana. O meio utilizado para troca continha o dobro da concentração dos agentes indutores. As células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ até a diferenciação celular e monitoradas sob microscopia invertida. Para diferenciação em adipócitos foi utilizado meio α -MEM 15% SBF suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para diferenciação em osteoblastos foi utilizado meio α -MEM 7,5% SBF suplementado com 0,10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Brasil), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato (Reagem, Brasil). Após a diferenciação, as células foram identificadas por colorações histoquímicas: Sudam III para os adipócitos e Von Kossa para os osteoblastos.

3.7 Extração de RNA pelo método de Trizol

A extração do RNA total das MSCs e HSCs foi realizada pelo método de TRIzol™ (Invitrogen, USA). A uma suspensão de até 5x10⁶ células foi adicionado 1 mL de TRIzol. Esta solução foi homogeneizada e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, para a completa dissociação de complexos nucleoproteicos. Em seguida adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio a cada mL de Trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 12000 g a 4°C. Após esta centrifugação ocorreu a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica).

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de TRIzol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi

homogeneizado por inversão, seguido de incubação overnight a - 80°C e então centrifugado novamente a 12000 g por 15 minutos, 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA lavado com etanol 75%/água RNase-free, seguido de centrifugação a 12000 g por 5 minutos, 4°C. O RNA obtido foi secado por 10-20 minutos (até total evaporação do etanol), ressuspenso em 10µL de água RNase-free e armazenado a - 80°C. Posteriormente, o RNA foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA/ml no comprimento de onda de 260 nm. Após a quantificação do RNA, eles foram diluídos para concentração de 1µg de RNA/mL e a integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose a 1%.

3.8 Purificação do RNA

Após a extração do RNA das amostras de MSC e HSCs, foi realizada uma etapa de digestão por DNase seguida pela purificação do RNA pelo kit comercial *RNeasy* (Qiagen, USA). O RNA foi dissolvido em 87,5 µL de H₂O *RNase-free* e adicionou-se 10 µL de buffer RDD e 2,5 µL da solução estoque de DNase I previamente preparada. Em seguida, foram adicionados 350 µL de buffer RLT e 250 mL de etanol 96-100%. Após homogeneização, o volume total da amostra (700 µL) foi transferido para uma mini-coluna do kit e centrifugou-se por 15 segundos a ≥ 10.000 rpm. Posteriormente, foi realizada uma etapa eliminação de qualquer contaminação por DNA genômico pela adição de 350 µL de buffer RW1 e centrifugação de 15 segundos a ≥ 10.000 . Em seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem com 500 µL de buffer RPE e centrifugações a ≥ 10.000 rpm por 15 segundos e 2 minutos, consecutivamente. A mini-coluna contendo RNA foi encaixada em um tubo coletor de 1,5 mL e adicionado 30-50 µL de água RNase-free seguido de centrifugação por 1 minuto a ≥ 10.000 rpm. O volume final eluído era o RNA purificado. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose. O RNA total purificado foi armazenado em freezer a - 80°C até o momento da realização dos experimentos de análise da expressão gênica por *microarrays*.

3.9 Microarrays de oligonucleotídeos

A análise do perfil da expressão gênica em larga escala foi realizada pelo sistema comercial *One-color Microarrays-Based Gene Expression Analysis Protocol*, o *Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) em lâminas com 4 *microarrays* de 44.000 sondas cada (4x44k). Este sistema consistiu da seguinte metodologia: 10 ng de poly(A)+

RNA ou 1 µg de RNA total ajustado para 5,3 µL de volume final como molde da síntese de cDNA. Foi adicionado junto ao RNA, 5 µL de Spike-Mix (1:5) como controle interno de reação. A síntese da primeira fita do cDNA foi realizada por transcrição reversa pelo oligonucleotídeo de DNA contendo um sítio promotor da enzima T7 RNA polimerase. Em seguida, foi feita a síntese da segunda fita do cDNA, o qual é utilizada como molde para a reação de transcrição *in vitro* que produz o cRNA alvo. O processo de transcrição das fitas de cDNA foi realizada em banho de 40°C por 2 horas e 65°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e armazenadas a -20°C, *overnight*. A transcrição e amplificação *in vitro* do cRNA foi realizada no dia seguinte. Durante a transcrição e amplificação do cRNA, o fluorocromo cianina-3 (Cy3) foi incorporado ao cRNA por ligação CTP.

Após o tratamento com DNase e purificação com o *RNeasy Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), o cRNA amplificado foi quantificado usando o *NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer* através do método *microarray measurement* e foi determinado a concentração do fluorocromo Cy3 (pmol/µL), bem como a relação de absorbância do 260nm/280nm e a concentração do cRNA (ng/µL). Nesse ponto, as amostras obrigatoriamente devem ter apresentado valores < 1,65 µg de cRNA e < 9,0 pmol/µL de cianina para realização do processo de hidridização.

Foram utilizados 1,65 µL de cRNA marcado com Cy3 de cada amostra, 11 µL de 10X agente de bloqueio e 2,2 µL de 25X tampão de fragmentação para hidridização em lâminas 4x44k de acordo com as instruções do fabricante. Os cRNAs amplificados e purificados foram fragmentados a 60°C por 30 minutos em tampão de fragmentação 2x e, em seguida, aplicados nas lâminas. O processo de hibridização foi realizado por 17 horas, a 65°C, sob agitação (300 rpm).

Após a hibridização, foram realizadas lavagens consecutivas com o GE *wash buffer* 1 (1 minuto), GE *wash buffer* 2 (1 minuto), acetonitrila (10 segundos) e *Stabilization and drying solution* (30 segundos) para remoção das moléculas não ligadas ou ligadas inespecificamente. Em seguida os *arrays* foram scaneados no scanner *GenePix 4000B* (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) para obtenção das imagens pelo *Agilent feature extraction software* (Agilent Technologies).

3.10 Análises in silico dos resultados de expressão gênica

3.10.1 Pré-processamento, normalização e estatística

As análises iniciais dos dados de expressão gênica foram realizadas através da *Plataforma R* (<http://cran.r-project.org>) em colaboração com o grupo de bioinformatas do Hemocentro de Ribeirão Preto, “Bioinformatic Team-BiT” (<http://cbhh2003.fmrp.usp.br/bit/>), coordenado pelo Prof. Dr. Wilson Araújo Silva Júnior (Departamento de Genética da FMRP-USP). Os dados obtidos pelo *Feature Extraction* versão 9.5.1 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) foram reconhecidos e inseridos na *Plataforma R*. No ambiente R as etapas de pré-processamento dos dados e análise estatística foram conduzidas com o uso de algoritmos disponíveis no projeto *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/>).

Na etapa de pré-processamento o pacote de funções R “*Agi4x44PreProcess*” foi utilizado para: 1) Anotação gênica das sondas com o pacote de funções “*hgug4112a.db*”; 2) Transformação logarítmica dos sinais (*log2*); 3) Correção do sinal de *background* com o algoritmo *normexp* (130); 4) Normalização entre todas as amostras pelo algoritmo *quantile*; 5) Filtragem de sondas com diferentes tipos de erros na captura do sinal (sondas controles, com sinal não distinguível do sinal do *background*, com saturação no sinal, com sinal abaixo dos controles negativos, com sinal não uniforme, ou consideradas *outliers*); 6) Sumarização das intensidades de sinais das sondas replicadas por meio do cálculo da mediana dos sinais; 7) Eliminação dos genes mapeados nos cromossomos sexuais e eliminação de sondas não mapeadas em genes conhecidos.

As sondas com maior variância entre todas as amostras foram selecionadas e submetidas a algoritmos de agrupamento hierárquico simples e um segundo agrupamento com 1000 replicatas para obter um agrupamento consenso (131). Os parâmetros usados nas análises incluíram a distância euclidiana e o método de ligação média (*Pairwise Average Linkage*). A identificação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos hierárquicos foi realizada utilizando o pacote *Linear Models for Microarray Data* (LIMMA) (<http://www.statsci.org/smyth/pubs/limma-biocbook-reprint.pdf>).

3.10.2 Análise da expressão absoluta e diferencial de categorias pré-definidas

Os genes foram classificados em categorias pré-definidas para análise de expressão absoluta e diferencial entre as MSCs e HSCs de pacientes com T1D e indivíduos controles saudáveis.

A classificação em (1) colágenos, (2) integrinas, (3) lamininas, (4) outras moléculas de adesão, (5) citocinas e fatores de crescimento, (6) receptores de citocinas e fatores de crescimento, (7) quimiocinas e (8) receptores de quimiocinas foi feita de acordo com a categoria *BRITE*, disponível no banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (132) e em (9) fatores de transcrição, de acordo com a função molecular *Transcription Factor Activity* presente em *Molecular Signatures Database* do software GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) (133).

As diferentes categorias foram representadas em forma de heatmaps (de expressão absoluta e expressão diferencial), gerados pelo módulo *HeatMapView* presente no software Gene Pattern 2.0 (134). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana.

Para representação da expressão absoluta, os genes de cada categoria foram classificados em ordem crescente, de acordo com o valor médio da expressão do grupo controle (MSCs e HSCs controles). Genes com valor de expressão média acima de 120 ($EV > 120$) foram considerados altamente expressos. Para os heatmaps de expressão diferencial, foram representados somente genes com $p < 0.05$ e *Fold-Change* (FC) > 2.0 para MSCs e $p < 0.005$ e FC > 2.0 para as HSCs, os quais foram ordenados por FC.

Para simplificação, os heatmaps de expressão absoluta encontram-se com esquema de cor global (utilização dos valores mínimo, médio e máximo de todo *dataset*) em preto, branco e azul, no qual o azul representa alto valor de expressão absoluta. Os heatmaps de expressão diferencial foram representados pela escala clássica, de cor relativa (valores mínimo, médio e máximo para cada gene) em verde, preto e vermelho. Na qual verde e vermelho representam, respectivamente, genes reprimidos e induzidos.

3.10.3 Análise DAVID

O enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizado através do software DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (135, 136). Os símbolos oficiais dos genes diferencialmente expressos (reprimidos e induzidos) foram importados para o programa e o módulo *Functional Annotation Chart* foi empregado para análise posterior. Nesse módulo, foi realizada a ontologia padrão disponível pelo programa (*GO FAT*) de todas as categorias do *Gene Ontology* (processo biológico, função molecular e componente celular), além da análise de vias disponíveis no banco de dados *KEGG Pathway*.

Após correção de Benjamini, as categorias e vias com valores de $p > 0.05$ foram consideradas biologicamente significativas.

3.10.4 Gene set enrichment Analysis (GSEA)

A análise de enriquecimento foi realizada através do software GSEA versão 2.07 do *Broad Institute* (Massachusetts Institute of Technology, *MIT*). Os valores de expressão das sondas diferencialmente expressas ($p > 0.05$ para MSCs e $p < 0.005$ para HSCs, independente do FC) foram importados para o programa e a análise de enriquecimento foi realizada para as categorias do *Gene Ontology* e *KEGG Pathway*, com a utilização de 1000 permutações do tipo *gene_set* para cálculo do *p value*. O restante dos parâmetros utilizados foram os padrões, exceto para “*collapsing mode for sonda sets => 1 gene*”, no qual adotamos o valor representativo da mediana.

Categorias com *nominal (NOM) p value* < 0.05 e *FDR (false discovery rate)* < 0.25 foram consideradas estatisticamente significativas.

3.10.5 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Os *Gene Symbols* e os valores de *Fold Change* (FC) das sondas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$ para as MSCs) entre os grupos (T1D x CTRL; D180 x CTRL e D180 x T1D) foram importados para o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems, Inc.) para análise das vias de sinalização, vias canônicas e funções.

3.10.6 Diagrama de Venn

Os diagramas de Venn foram gerados pelo módulo *VennDiagram* do software *Gene Pattern* 2.0 (134).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das amostras pré-microarray

4.1.1 Caracterização morfológica e imunofenotípica das MSCs

A Figura 1 mostra a morfologia de colônias de MSCs, isoladas de indivíduos diabéticos e controles, na 3ª passagem. As MSCs isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide característica.

Figura 1. Morfologia das MSCs isoladas de pacientes com T1D e de indivíduos controles.

Fotos representativas de MSCs isoladas da medula óssea (população de células aderentes fibroblastoides, afiladas) de um indivíduo saudável e de um paciente com T1D, expandidas em meio alpha-MEM acrescido de 15% de SBF. (A) MSCs de indivíduo saudável na 3ª passagem (aumento 40X). (B) MSCs de indivíduo saudável na 3ª passagem (aumento 100X). (C) MSCs de paciente com T1D na 3ª passagem (aumento 40X). (D) MSCs de paciente com T1D na 3ª passagem (aumento 100X). (E) MSCs de paciente com T1D na 3ª passagem com fenótipo senescente, células achatadas (aumento 40X). (F) MSCs de paciente na 3ª passagem com fenótipo senescente (aumento 100X).

Com relação à fenotipagem, mesenquimais dos pacientes (pré e pós-AHSCT) apresentaram colônias de acordo com o descrito na literatura, com alta porcentagem de

células CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD29⁺, CD13⁺, HLA-ABC⁺, CD44⁺ e CD49e⁺ (> 80%); porcentagem intermediária de células CD54⁺, CD166⁺, CD106⁺ e STRO1⁺ e expressão negativa dos marcadores hematopoéticos CD45, CD14, CD34, HLA-DR, KDR e CD51/61 (Figura 2), que corrobora com os dados da literatura (137).

Figura 2. Caracterização imunofenotípica representativa de MSCs isoladas de um paciente com T1D pré-AHSCT.

MSCs na 3ª passagem foram marcadas com anticorpos monoclonais contra vários antígenos de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Os diversos marcadores foram analisados através de marcações simples. Para análise, foi desenhada uma *gate* na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da *gate* de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 1 (FL1, FITC - isotiocianato de fluoresceína) ou fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina).

4.1.2 Análise da capacidade de diferenciação das MSCs

MSCs foram induzidas à diferenciação em meios específicos, conforme descrito na literatura. Todas as amostras de MSC diabéticas (pré e pós-AHSCT) demonstraram diferenciação adipogênica e osteogênica. As Figuras 3 e 4 representam a diferenciação de células controles e diabéticas, respectivamente. Não foram encontradas diferenças relevantes entre MSCs controles e diabéticas com relação à capacidade de diferenciação adipogênica ou osteogênica.

Figura 3. Diferenciação das MSCs isoladas da medula óssea de doadores controles em adipócitos e osteoblastos.

(A) MSCs indiferenciadas não induzidas na terceira passagem, controle negativo (aumento 100x). (B) MSCs diferenciadas na terceira passagem em adipócitos, demonstrada pela formação de vacúolos lipídicos corados com Sudan II-escarlata (aumento 100x). (C) MSCs diferenciadas na terceira passagem em osteoblastos, demonstrada pela deposição de matriz mineralizada revelada pela coloração de von Kossa (aumento 100x).

Figura 4. Diferenciação das MSCs isoladas da medula óssea de pacientes com T1D pré-AHSCT em adipócitos e osteoblastos.

(A) MSCs indiferenciadas não induzidas na terceira passagem, controle negativo (aumento 100x). (B) MSCs diferenciadas na terceira passagem em adipócitos, demonstrada pela formação de vacúolos lipídicos corados com Sudan II-escarlata (aumento 100x). (C) MSCs diferenciadas na terceira passagem em osteoblastos, demonstrada pela deposição de matriz mineralizada revelada pela coloração de von Kossa (aumento 100x).

4.1.3 Análise da pureza das HSCs (CD34⁺)

Todas as amostras de HSCs purificadas da medula óssea dos pacientes com T1D pré-AH SCT apresentaram $\geq 90\%$ de positividade para o marcador CD34, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de positividade para o marcador CD34 positivas em amostras de HSCs isoladas por coluna imunomagnética

Paciente	Pureza (%)
DM 2 (MGB)	97,22
DM 5 (TAS)	99,01
DM 6 (RAOA)	96,43
DM 17 (MQS)	98,29
NM40	90,01
NM42	95,55
NM43	81,40
NM44	91,06

A Figura 5 apresenta uma análise imunofenotípica representativa de HSCs CD34⁺ isoladas por coluna imunomagnética.

Figura 5. Análise imunofenotípica de HSCs CD34⁺ isoladas da medula óssea de um indivíduo controle.

HSCs (CD34⁺) foram isoladas por coluna imunomagnética, uma alíquota foi marcada com anticorpo anti-CD34 e analisada por citometria de fluxo. O histograma de CD34 PE mostra que 97,80% das células purificadas expressam CD34. Análise representativa de uma amostra de HSCs (CD34⁺) purificadas.

4.1.3 Extração do RNA

Foi realizada a extração de RNA das amostras de MSCs (diabéticas [pré e pós-AHSCT] e controles) criopreservadas. HSCs (diabéticas e controles) isoladas por colunas imunomagnéticas foram diretamente lisadas e congeladas em TRIzol. As fotos representativas dos géis de agarose encontram-se disponíveis em Apêndices e Anexos.

4.2 Hibridização das lâminas, pré-processamento e normalização dos dados

4.2.1 Padronização da plataforma *Agilent Technologies*

A implantação e padronização da plataforma de *microarrays* da marca *Agilent Technologies* (GE Healthcare) foi realizada anteriormente ao nosso trabalho, no Laboratório de Hematologia do HC-FMRP-USP. Foram utilizadas lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos com 44.000 sondas. Foram utilizadas amostras controles de células mononucleares de sangue periférico para a padronização das hibridizações. Os resultados de controle de qualidade, verificados pela qualidade das imagens escaneadas e controles internos, foram muito satisfatórios (de acordo com as normas do fabricante).

4.2.2 Hibridização das lâminas de *microarray*

O RNA total de 20 amostras (12 de MSCs e 8 de HSCs) foi extraído primeiramente pelo método de Trizol e em seguida submetido ao processo de purificação pelo kit *RNeasy* (Qiagen). A concentração final de RNA e a razão A260/A280 nas amostras foi determinada pelo espectrofotômetro *NanoDrop* (ND-1000 UV-VIS). A integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Os RNAs purificados apresentaram excelente qualidade (razão A260/A280 entre 2,0-2,1; Apêndices e Anexos) e integridade. Foi utilizado 1µg de RNA total de cada amostra no processo de marcação com o kit *One-color microarrays-based gene expression analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Após a síntese do cRNA marcado com Cy3, as amostras foram purificadas, quantificadas e hibridizadas em 6 lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos (formato 4x44k). A Figura 6 esquematiza a disposição das amostras nas lâminas.

Figura 6. Distribuição das amostras nas 6 lâminas utilizadas para a hibridização dos microarrays das MSCs e HSCs.

Acima de cada lâmina encontra-se o respectivo número. (a) L127: MSCs de pacientes pré-AHSCT; L128: MSCs de pacientes pós-AHSCT; L454 e L452: MSCs de indivíduos controles, não diabéticos. (b) L451: HSCs de pacientes diabéticos e L841: HSCs controles.

4.2.3 Extração dos dados dos microarrays

As lâminas foram escaneadas através do scanner *GenePix 4000B* e software *GenePix Pro 6.0* (Axon Instruments, Foster city, CA, USA) em três diferentes PMT (*photon multiple transmission*). Foram avaliados diversos parâmetros referentes à qualidade de marcação das sondas. A quantidade de *spots* saturados foi avaliada a cada escaneamento e os dados referentes à hibridização foram analisados através de um software desenvolvido pela Agilent (*Feature Extraction* versão 9.5.1), o qual gera um relatório com vários parâmetros de qualidade, como: *grid*, distribuição espacial de todos os *outliers*, histograma do sinal dos *spots*, porcentagem de saturação dos *spikeIns* e sondas não-controles e porcentagem do coeficiente de variância (CV).

Todas as lâminas apresentaram cerca de 30 a 60 *spots* (*spikeIns* e sondas não-controle) saturados e exibiram um *grid* normal em cada *array* (Figura 7A e 7B). O *grid* representa a distribuição dos *spots* e indica a qualidade na síntese destes. O controle da reação de hibridização é avaliado através da concentração e sinal de fluorescência logaritmo dos *spikes*, representado pela equação da reta (Figura 7C). A porcentagem (%) do CV (coeficiente de variância) representa a média na intensidade de fluorescência emitida em todos os *spots*. Segundo as especificações do *software*, a qualificação da % CV igual a 10 é bom, de 5 a 9 é ótimo, menor que 5, é excelente. Todos os *arrays* apresentaram valor menor que 5 na % CV (Figura 7D). O histograma do sinal, representado pelo gráfico da curva de Gauss, mostra a distribuição do sinal de fluorescência (Figura 7E). Os *outliers*,

pontos enquadrados fora da área de análise, decorrente da normalização do canal de fluorescência, devem apresentar um valor inferior a 0.5% (Figura 7F).

Em resumo, todos os parâmetros de qualidade da hibridização das amostras estiveram de acordo com as normas do fabricante. Portanto, os dados de expressão gênica das amostras de MSCs e HSCs obtidas nesses experimentos puderam ser utilizados de forma segura.

Figura 7. Dados de hibridização das lâminas de *microarrays* gerados pelo *Agilent Feature extraction software QC report*.

(A) Representação dos *spots* localizados nos quatro lados da lâmina. (B) Tabela da estatística do sinal de fluorescência dos *spikeIns* e sondas não-controle. (C) Curva-log da concentração dos *spikes* vs log-sinal de fluorescência. (D) Porcentagem de CV de fluorescência do *microarray*; (E) Histograma do sinal do *microarray*; (F) Distribuição dos outliers.

4.2.4 Pré-processamento e normalização dos dados brutos

A normalização e análise estatística dos dados brutos extraídos dos *microarrays* foram realizadas através da Plataforma R (<http://cran.r-project.org>).

As figuras seguintes representam as análises de qualidade dos *arrays* de MSCs após normalização. O mesmo foi realizado para as HSCs (Apêndices e Anexos).

Os *MA plots*, que representam a distribuição das massas (intensidade dos sinais), foram concentrados no eixo x, que indica boa qualidade de hibridização (Figura 8).

Figura 8. *MA plots* dos 4 *arrays* com maior (acima) e menor (abaixo) valor de D.

A distribuição dos valores em um *MA plot* deve estar concentrada no eixo x ($M = 0$), na qual M não deve tender como uma função de A . O valor de D encontra-se na parte superior de cada *MA plot*. Array 2 = DM13; Array 5 = DM01 D180; Array 6 = DM13 D180; Array 7 = DM07 D180; Array 8 = DM2 D180; Array 10 = NM19; Array 11 = NM27 e Array 12 = NM20.

Nenhum *array* foi considerado *outlier* por essa análise (Figura 9).

Figura 9. Teste de Hoeffding para a detecção de *outliers*.

As barras indicam a ordem original dos *arrays*. Um *threshold* de 0.15 foi usado, representado pela linha vertical. Nenhum *array* ultrapassou o *threshold* nessa análise ($D > 0.15$). Array 1 = DM1; Array 2 = DM13; Array 3 = Array 4 = DM2; Array 5 = DM1 D180; Array 6 = DM13 D180; Array 7 = DM7 D180; Array 8 = DM2 D180; Array 9 = NM01; Array 10 = NM19; Array 11 = NM27 e Array 12 = NM20.

Posteriormente, realizamos uma análise da similaridade entre as amostras (Figura 10). Pôde-se notar maior similaridade das amostras dos pacientes (pré e pós-transplante) entre si, assim como dos *arrays* controles. Nenhuma amostra foi considerada *outlier* (Figura 11).

Figura 10. Representação, em forma de heatmap, das distâncias entre os *arrays*.

Os valores estão representados de 0.0 a 1.0 (escala do azul ao amarelo), no qual 0.0 indica identidade completa. A distância d_{ab} entre duas amostras, a e b , é computada como diferença média absoluta (L1) entre os respectivos *arrays* (dados de todas as sondas, sem filtro). Nenhuma amostra foi considerada *outlier*. Array 1 = DM1; Array 2 = DM13; Array 3 = Array 4 = DM2; Array 5 = DM1 D180; Array 6 = DM13 D180; Array 7 = DM7 D180; Array 8 = DM2 D180; Array 9 = NM01; Array 10 = NM19; Array 11 = NM27 e Array 12 = NM20. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré AHSCT e D-POS = diabéticos pós AHSCT.

Figura 11. Representação, em forma de barras, da distância entre as diferentes amostras.

Baseado na distribuição dos valores de todas as amostras, o *threshold* de 9.35 foi admitido, indicado pela linha vertical. Nenhuma amostra foi considerada *outlier*. Array 1 = DM1; Array 2 = DM13; Array 3 = Array 4 = DM2; Array 5 = DM1 D180; Array 6 = DM13 D180; Array 7 = DM7 D180; Array 8 = DM2 D180; Array 9 = NM01; Array 10 = NM19; Array 11 = NM27 e Array 12 = NM20.

A Figura 12 representa a dispersão espontânea das amostras através de um PCA (*Principal Componente Analysis*). Os *arrays* de um mesmo grupo encontraram mais próximos entre si.

Figura 12. Dispersão espontânea das amostras dentre dois componentes principais (PCA) 2D.

As amostras de um mesmo grupo encontraram-se mais próximas, o que representa maior similaridade entre si. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré-AHSCT e D-POS = diabéticos pós-AHSCT.

A Figura 13 apresenta um *boxplot* da distribuição dos sinais de intensidade. Todas as amostras apresentaram mesma largura e posição. A Figura 14 apresenta o mesmo resultado, em gráfico de barras.

Figura 13. Distribuição das amostras quanto à intensidade dos sinais.

Cada boxplot representa uma amostra. Os boxplots apresentam-se na mesma posição e possuem a mesma largura, o que indica normalização ideal. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré-AHSCT e D-POS = diabéticos pós-AHSCT.

Figura 14. Distribuição das amostras quanto à intensidade dos sinais, em gráfico de barras.

Baseado na distribuição dos valores dentre todos os arrays, foi determinado como *threshold* o valor 0.00825, indicado por uma linha vertical. Teste de Kolmogorov-Smirnov. Array 1 = DM1; Array 2 = DM13; Array 3 = Array 4 = DM2; Array 5 = DM1 D180; Array 6 = DM13 D180; Array 7 = DM7 D180; Array 8 = DM2 D180; Array 9 = NM01; Array 10 = NM19; Array 11 = NM27 e Array 12 = NM20.

A estimativa das densidades reforça todos os parâmetros anteriores (Figura 15), na qual os *arrays* apresentaram as mesmas características.

Figura 15. Estimativa das densidades de intensidade das amostras.

Os dados apresentaram formas e valores similares, o que indica uma normalização ideal. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré-AHSCT e D-POS = diabéticos pós-AHSCT.

4.3 Análises in silico da expressão gênica global

4.3.1 Células estromais mesenquimais (MSCs)

4.3.1.1 Agrupamento das amostras

Após normalização, realizamos o agrupamento euclidiano das amostras, com as sondas com maior variância (Figura 16).

Figura 16. Dendrograma do agrupamento euclidiano das amostras.

O agrupamento foi realizado de acordo com as sondas de maior variância. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré-AHSCT e D-POS = diabéticos pós-AHSCT. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

Células de um mesmo grupo encontraram-se em um mesmo *cluster* (Figura 16). As amostras dos pacientes (pré e pós-transplante) agruparam-se em outro *cluster*, diferente das células controles.

Esses dados sugerem que MSCs de pacientes com T1D possuem perfil de expressão gênica distinto das de indivíduos controles não diabéticos. Ainda, MSCs pós-AHSCT sofrem certa modulação, porém, continuam mais parecidas com as células pré-transplante. Um resultado similar é observado no heatmap das sondas com maior desvio padrão (Figura 17).

Figura 17. Heatmap do agrupamento, não supervisionado, das amostras.

O agrupamento foi realizado de acordo com as 100 sondas com maior desvio padrão. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos pré-AHSCT e D-POS = diabéticos pós-AHSCT. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

A maioria das sondas representadas no heatmap foi reprimida no grupo diabético (pré e pós-transplante). No entanto, tal repressão foi menor no grupo pós-transplante (D180), e suporta uma discreta modulação pelo transplante (Figura 17).

4.3.1.2 Número de sondas diferencialmente expressas

Após essa análise mais “geral”, fomos à procura do número de sondas diferencialmente expressas entre os três grupos. Com base nas comparações e filtros estatísticos, obtivemos 24 listas de sondas. A Tabela 3 resume as comparações realizadas.

Tabela 3. Listas das comparações realizadas.

Estatística	Comparação
$p < 0.05$	
$p < 0.05 - FC \geq 2$	T1D x CTRL ; D180 x CTRL ; D180 x T1D
$p < 0.05 - FC \geq 2$	
$p < 0.05 - FC \leq (-2)$	
$p < 0.01$	
$p < 0.01 - FC \geq 2$	T1D x CTRL ; D180 x CTRL ; D180 x T1D
$p < 0.01 - FC \geq 2$	
$p < 0.01 - FC \leq (-2)$	
Condições estatísticas e comparações realizadas. T1D: MSCs de pacientes, pré-transplante; D180: MSCs de pacientes, pós-transplante; CTRL: MSCs controles, não diabéticas. Teste t, correção de Benjamini-Hochberg.	

A Tabela 4 apresenta o número de sondas identificadas em cada uma das análises, em todas as comparações.

Resumidamente, MSCs de pacientes diabéticos apresentaram uma significativa quantidade de sondas diferencialmente expressas em relação às células controles. MSCs pré-transplante tiveram mais sondas diferencialmente expressas do grupo controle do que aquelas isoladas após o transplante, o que indica a modulação de alguns genes pelo AHSCT. Tais sondas podem ser representadas pela comparação entre as MSCs de pacientes diabéticos (D180 x T1D).

Tabela 4. Número de sondas diferencialmente expressas.

Estatística	T1D x CTRL	D180 x CTRL	D180 x T1D
	Número de sondas		
$p < 0.05$	5887	3786	600
$p < 0.05$; $FC \geq 2$	2978	1315	391
$p < 0.05$; $FC \geq 2$ [hiper-reg]	1926	714	214
$p < 0.05$; $FC \leq (-2)$ [hipo-reg]	1052	601	177
$p < 0.01$	2690	1335	57
$p < 0.01$; $FC \geq 2$	2149	858	57
$p < 0.01$; $FC \geq 2$ [hiper-reg]	1515	496	52
$p < 0.01$; $FC \leq (-2)$ [hipo-reg]	634	362	5

Número de sondas diferencialmente expressas entre todas as comparações, nas diferentes condições estatísticas (test t, ajustado BH). T1D: MSCs de pacientes, pré-transplante; D180: MSCs de pacientes, pós-transplante; CTRL: MSCs controles, não diabéticas. Em vermelho, sondas induzidas e, em verde, as reprimidas. O número de sondas é referente ao primeiro grupo da comparação (T1D x CTRL, referente ao grupo T1D; D180 x CTRL, referente ao grupo D180 e D180 x T1D, referente ao grupo D180).

4.3.1.3 Comparação dos grupos (T1D x CTRLs)

4.3.1.3.1 Diferença do perfil de expressão gênica global

Na comparação entre MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante e controles, encontramos 2978 sondas diferencialmente expressas ($p < 0.05$; $FC > 2$). Para $p < 0.01$, esse número foi de 2149 sondas. Dessas, 1515 foram induzidas e 634 foram reprimidas nas MSCs dos pacientes com T1D (Tabela 4, Figura 18).

Figura 18. Volcano *plot* das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 (T1D) e MSCs de indivíduos não diabéticos (CTRL).

Cada *plot* representa uma sonda. As sondas hiper-reguladas em MSCs de pacientes encontram-se em vermelho e as hiporreguladas, em verde. A escala de significância é inversa à intensidade da cor. 2149 foram diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes e MSCs de controles (T1D x CTRL). Das quais, 1515 foram hiper-reguladas e 634 foram hiporreguladas ($FC > 2$, $p < 0.01$, teste t, correção de Benjamini Hochberg).

A Figura 19 apresenta um heatmap dessa análise.

Figura 19. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 e MSCs de indivíduos controles ($FC > 2$, $p < 0.01$).

A maior parte das sondas estava hiper-regulada em MSCs de pacientes. D-PRE: MSCs de pacientes diabéticos; CTRL: MSCs de controles, não diabéticas. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

4.3.1.3.2 *Análise da expressão de categorias pré-definidas*

MOLÉCULAS DE ADESÃO

▪ *Expressão absoluta*

MSCs compreendem uma população estromal presente em, virtualmente, todos os órgãos, e possuem importante papel na manutenção estrutural desses tecidos. Dessa forma, fomos

investigar a expressão absoluta de colágenos, integrinas, lamininas e outras moléculas envolvidas na manutenção da matriz extracelular (ECM), adesão célula-célula e célula-ECM (Figura 20).

O colágeno é constituído por um grupo de proteínas que forma o principal constituinte conectivo dos tecidos. Como esperado, MSCs (diabéticas e controles) apresentaram significativa expressão de genes responsáveis por sua codificação. Dentre os principais, houve maior expressão de genes que codificam os colágenos do tipo I, IV, V, VI e VIII (Figura 20a). Klein e colaboradores (1995) demonstraram que o colágeno VI é importante na interação entre células hematopoéticas e o estroma da medula óssea (138).

Figura 20. Heatmaps da expressão absoluta de Colágenos, Integrinas e Lamininas por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão de Colágenos, (b) Integrinas e (c) Lamininas. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em log₂; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes do tipo 1 (Diabetic; n = 4) e indivíduos controles saudáveis (Control; n = 4).

Em seguida, analisamos a expressão das principais proteínas formadoras da membrana basal, as lamininas. Formadas por três cadeias (α , β e γ), elas participam em eventos de diferenciação celular, migração e adesão. MSCs apresentaram alto valor de expressão absoluta dos três tipos de cadeia, com maior destaque para a cadeia β (Figura 20c). A laminina-5, formada pelas cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ e $\gamma 2$ (atualmente denominada laminina-

332) é expressa por células estromais mesenquimais humanas (139), que corrobora com os valores de expressão observados.

Figura 21. Heatmaps da expressão absoluta de outras moléculas de adesão por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) em células controles. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em $\log_2$; a intensidade do azul é proporcional ao valor de expressão. Pacientes com diabetes do tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Presentes na superfície celular, as integrinas são de suma importância na interação célula-célula e célula-ECM. Dentre seus ligantes, destaca-se o colágeno e as lamininas. Essa interação regula o ciclo, morfologia e motilidade celular. CD29 (*ITGB1*), CD51 (*ITGAV*) e CD49a (*ITGA1*) apresentaram alta expressão em ambos os grupos e fazem parte do painel de marcadores de superfície das MSCs (Figura 20b). Em 2010, Semon e colaboradores, através de citometria de fluxo e imunofluorescência, demonstraram que MSCs expressam diversas integrinas (140). Nossos resultados foram muito similares.

Além das três classes descritas anteriormente, outras moléculas de adesão apresentaram alto valor de expressão ($EV > 120$) em MSCs (Figura 21). Dentre as principais moléculas já descritas, podemos destacar a alta expressão dos marcadores CD90 (*THY1*)

(137), CD44 (141-143) e CD146 (*MCAM*) (74). Muitas das moléculas com altos níveis de expressão em nossa análise foram anteriormente descritas em estudo de proteômica (144).

VCAM-1 e ICAM-1 são necessárias para o papel imunossupressor das MSCs (92). Recentemente, foi demonstrada a expressão de VCAM-1 por MSCs no nicho hematopoético na medula óssea. A interação entre VCAM-1 e VLA-4, presente em HSCs, é importante para a manutenção e regulação das HSCs (75). Fibronectina-1 (*FN1*), N-caderina (*CDH2*) e ICAM-1 (*ICAM1*) também interagem com HSCs durante a hematopoese (145).

Dentre todos os genes presentes na Figura 21, o *CYR61*, que codifica uma molécula com função angiogênica, foi o mais expresso. Estrada e cols. demonstraram que *CYR61* está, abundantemente, presente no secretoma de MSCs. Interessantemente, a propriedade angiogênica das MSCs foi dependente desse fator (146).

In vitro, MSCs que expressam maiores níveis de caderina-11 (*CDH11*) possuem maior afinidade por HSCs (147). *CDH11* foi altamente expresso em nossa análise, entretanto, sua relevância, *in vivo*, permanece incerta.

▪ *Expressão diferencial*

A análise anterior forneceu melhor compreensão dos potenciais componentes relacionados à matriz extracelular expressos por MSCs. Apesar de nossa análise ter sido realizada em 3ª passagem, a alta expressão absoluta de moléculas relevantes na hematopoese sugere que MSCs em cultura preservam algumas de suas funções *in vivo*. Com essa visão, analisamos a expressão diferencial das moléculas de adesão entre MSCs de pacientes diabéticos (pré-AHSCT) e controles ($FC > 2$ e $p < 0.05$) (Figura 22).

Como descrito anteriormente, de suma importância na interação MSCs-HSCs, *VCAM1* foi hiporregulado em MSCs de pacientes diabéticos. Aparentemente, em dados preliminares de nosso laboratório, essa diferença não prejudica a propriedade imunossupressora das MSCs dos pacientes diabéticos. No nicho hematopoético, a expressão de *VCAM1* em MSCs nestina⁺ é finamente regulada por hormônios e neurotransmissores, na qual G-CSF e agonistas simpáticos (β_3 -adrenérgicos) diminuem sua expressão (75). Em elegante trabalho, foi demonstrado que o ambiente medular de camundongos diabéticos possui uma exacerbação da inervação simpática (148). Esse achado poderia explicar a repressão da expressão de *VCAM1* observada em nossa análise nas MSCs de pacientes diabéticos.

O coestimulador *CD86* foi altamente expresso em MSCs de pacientes ($FC > 20$) em comparação com células controles. Embora as MSCs não expressem moléculas tais

coestimuladores (CD80, CD86, CD40), a expressão absoluta de *CD86* foi tão alta em MSCs de pacientes diabéticos que alcançou níveis compatíveis ao de outras moléculas sabidamente expressas por MSCs. O mesmo ocorreu com a expressão de semaforina 4A (*SEMA4A*), molécula que potencializa a ativação de células T (149-151). Em determinadas condições inflamatórias, foi demonstrado que as MSCs aumentam a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e estimulam respostas imunológicas (85, 86, 88, 152, 153).

A adesão de células contráteis à ECM é regulada pela expressão da integrina $\alpha 7$ (*ITGA7*) e CD29 ($\beta 1$, *ITGB1*) (154). Ambos foram altamente expressos por MSCs (Figura 20b). Desses, a expressão de *ITGA7* foi reprimida nas células dos pacientes (**Figura 22**). O mesmo foi observado para *LAMA3*, componente da laminina-5. Apesar de relacionadas com a adesão e migração de diversas células, a relação de tais moléculas com o nicho hematopoético permanece desconhecida.

Figura 22. Heatmap da expressão relativa de moléculas de adesão diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

QUIMIOCINAS E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

▪ *Expressão absoluta*

As quimiocinas constituem uma família de pequenas citocinas (8-10kDa) envolvidas em diversos processos biológicos, como tráfego leucocitário, hematopoese, angiogênese e organogênese. Além do baixo peso molecular, distinguem-se das demais citocinas pela ligação a receptores que sinalizam através da proteína G (155).

As MSCs migram para sítios inflamatórios e regulam o tráfego de diversas células do sistema imunológico. Quimiocinas e seus receptores são moléculas fundamentais para tais atividades. A relação entre MSCs, quimiocinas e receptores permanece inconclusiva. As diferentes fontes de isolamento e condições de cultura dificultam a padronização dos trabalhos e influenciam diretamente na expressão dessas moléculas (90). Em nossas condições de cultura, realizamos a análise da expressão absoluta de quimiocinas e receptores em nossas células.

CCL2 apresentou o maior valor de expressão absoluta (Figura 23a). Também conhecido como MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), ela recruta monócitos para sítios inflamatórios (156) e está presente em culturas de MSCs (157), nas quais é responsável por sua propriedade imunossupressora em alguns casos (93, 158-160). Na medula óssea, *CCL2* expressa por MSCs regula a emigração de monócitos (161).

Descrita em cultura de células estromais da medula óssea há quase 2 décadas (162, 163), *CXCL12/SDF-1* é a quimiocina mais caracterizada no contexto hematopoético. A expressão de *CXCL12* em MSCs e sua interação com *CXCR4*, expresso em HSCs, não possui apenas papel quimiotático, mas constitui também é uma das principais vias de manutenção da hematopoese (66, 69, 75, 160, 164-169). De acordo, MSCs apresentaram altos níveis de expressão absoluta dessa quimiocina (Figura 23a).

Dentre outras, *CCL24*, que age principalmente em eosinófilos (170), *CKLF* (*chemokine-like factor*), em neutrófilos, monócitos e linfócitos (171), assim como *CXCL5*, que recruta neutrófilos (172), apresentaram altos níveis de expressão absoluta nas MSCs de pacientes e controles em nossas análises.

Figura 23. Heatmaps da expressão de moléculas relacionadas à quimiotaxia por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão absoluta de moléculas e (b) receptores com atividade quimiotática. Azul indica alto valor de expressão. Os valores de expressão estão representados em log₂. (c) Análise da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células de pacientes e de indivíduos controles. Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Adicionalmente, é descrito que MSCs são capazes de migrar mediante estímulos inflamatórios por mecanismos, provavelmente, dependentes da expressão de receptores de quimiocinas (173-181).

Existe grande contradição na literatura, no entanto sugere-se que MSCs expressem CCR1, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1 (157, 181-186). Em nossa análise, nenhum receptor apresentou alto valor de expressão absoluta (EV > 120) (Figura 23b), o que sugere que, em nossas condições, as MSCs provavelmente não expressam níveis significativos de receptores de quimiocinas.

Apesar da grande similaridade das condições de cultura nos diferentes trabalhos, não está claro o porquê dessa contradição observada. A grande heterogeneidade das MSCs e as diferentes metodologias empregadas na análise de expressão podem explicar, pelo menos parcialmente, essa contradição. Fato é que a funcionalidade desses receptores permanece indiscutível. Citocinas pró-inflamatórias são fortes indutoras de expressão desses receptores, o que poderia explicar a baixa expressão absoluta encontrada em nossa análise (187). Pode ser que, em condições homeostáticas, MSCs não expressem níveis significativos desses receptores, no entanto, estímulos inflamatórios podem induzi-los rapidamente e possibilitar a atividade migratória das MSCs.

▪ *Expressão diferencial*

As quimiocinas CCL13, CCL15, CXCL16 e CCL3L3 (*chemokine [C-C motif] ligand 3-like 3*) e os receptores CCR3, CXCR5 e DARC (*Duffy antigen/chemokine receptor*) que apresentaram baixa expressão absoluta ($EV < 120$) foram induzidas em MSCs dos pacientes diabéticos. CCL7, de baixa expressão absoluta, foi reprimido em MSCs de pacientes (Figura 23c). A relevância biológica de tais achados permanece desconhecida.

Por outro lado, CCL24 e CXCL5 apresentaram altos níveis de expressão absoluta e foram reprimidos em MSCs de pacientes. Eles atraem eosinófilos e neutrófilos, respectivamente, o que sugere menor ação quimiotática de MSCs sobre essas células.

CCL2, descrito anteriormente, foi reprimido em MSCs de pacientes diabéticos. Após ser secretado, CCL2 pode sofrer clivagem por metaloproteases e gerar um antagonista de CCR2, seu receptor cognato. Em MSCs deficientes dessa quimiocina a capacidade de suprimir a produção de IL-17 por células T ativadas é diminuída e, consequentemente, elas perdem o efeito protetor em modelo EAE (159). A inibição da produção de anticorpos por plasmócitos também é dependente desse mecanismo (158). Em ambiente tumoral, o CCL2 secretado por MSCs recruta e modula monócitos (188). Se no diabetes tipo 1 ocorre menor emigração de monócitos da medula óssea ou se MSCs de pacientes diabéticos possuem menor efeito supressor sobre células Th17 ou plasmócitos, permanece desconhecido.

De acordo com o que foi publicado pelo atuante grupo norte americano liderado pelo professor David Scadden, MSCs de pacientes diabéticos murinas apresentaram defeito na expressão de CXCL12 (148). CXCL12 é secretada por mecanismos dependentes de contato (165) e é responsável pela manutenção da quiescência, sobrevivência e migração de precursores hematopoéticos para a medula óssea (66, 189). Ainda na medula óssea, fibras nervosas fisicamente associadas às MSCs (75) são responsáveis pela oscilação circadiana da mobilização de HSCs para a periferia (190, 191). Como já comentado para VCAM1,

agonistas simpáticos (β_3 -adrenérgicos) também regulam negativamente a expressão de CXCL12 (75). Desse modo, a hiperatividade simpática observada na medula óssea diabética, em murinos (148) pode ter relação com nossos resultados, em humanos. Em conjunto, esses resultados sugerem uma desregulação do eixo CXCL12/CXCR4, de fundamental importância na regulação da hematopoese, nas MSCs de pacientes diabéticos.

METALOPROTEASES

▪ *Expressão absoluta*

Adicionalmente às quimiocinas e receptores, a migração através da ECM é facilitada por uma família de endopeptidases zinco-dependentes, capazes de degradar, virtualmente, qualquer componente da ECM (192). Essas enzimas são as chamadas metaloproteases (MMPs, *Matrix metalloproteases*). Dentre as mais diversas funções biológicas, MMPs atuam na migração de MSCs (193, 194) e HSCs (195-198). Enzimas relacionadas, subdivididas em dois grupos, (1) ADAMs, integrais da membrana (199-201) e (2) ADAMTS (*A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin motifs*), que são secretadas (202, 203), compreendem outra família. Juntas, MMPs, ADAM e ADAMTS são as principais responsáveis na degradação e remodelamento da ECM e, conseqüentemente, possuem importante papel no desenvolvimento de órgãos, processo de cicatrização, angiogênese, migração celular e processos patológicos, como na artrite e, principalmente, no câncer (204).

Em nossa análise, MSCs apresentaram alta expressão absoluta de diversas proteases (EV > 120). Dentre essas, MMPs do tipo 1, 2, 11, 14, 17 e 19, ADAMs do tipo 9, 10, 12, 15, 17 e 19, além de ADAMTS1, 2, 5, 7 e 12. Por fim, *ADAMTSL1*, que codifica outra enzima relacionada, também foi altamente expresso (Figura 24a).

Figura 24. Heatmaps da expressão de peptidases (MMPs e ADAMs) por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão absoluta. São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.05$). Azul indica alto valor de expressão. Os valores de expressão estão representados em $\log_2$. (b) Análise da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células de pacientes e de indivíduos controles. Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

MMP2 é bem caracterizada na migração (193, 194, 205, 206) e responsável pela imunossupressão realizada por MSCs em modelo de câncer (207).

Em adição à MMP2, MMP11 e MMP14 (MT1-MMP) foram descritas em MSCs (194, 195, 205, 208). Todas apresentaram altos níveis de expressão absoluta em nossa análise (Figura 28a).

Mannello e cols. publicaram uma revisão a respeito da expressão dessas proteases durante diferenciação de MSCs (209). A expressão de algumas ADAMs durante a condrogênese foi demonstrada (210). ADAM12, altamente expressa em nossa análise é necessária para a diferenciação de MSCs em células musculares lisas (211).

▪ *Expressão diferencial*

A expressão de *ADAM7* e *ADAMTSL3* foi induzida em MSCs de pacientes diabéticos. Por outro lado, *ADAMTS3* foi reprimido (Figura 24b). Nenhuma dessas moléculas teve alto valor de expressão absoluta (Figura 24a).

MT1-MMP (*MMP14*), a terceira metaloprotease mais expressa em nossa análise de expressão absoluta, potencializa o processo de migração das MSCs (194, 205) e foi hiper-regulada nas células diabéticas. Esse processo pode ser através da clivagem e ativação de MMP2 (212-217) ou de forma independente de MMP2 (218).

O mesmo foi observado para *MMP2*. De acordo com esses dados de expressão gênica diferencial, MSCs de pacientes diabéticos apresentaram maior capacidade migratória do que as controles (dados de nosso grupo, ainda não publicados). Ries e colaboradores observaram que citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de MMP2 e MT1-MMP (194), entretanto, não sabe-se se isso é válido para MSCs de pacientes diabéticos.

MMPs também clivam quimiocinas, citocinas e receptores relacionados. Dentre essas, as MMP2 e MT1-MMP que estão induzidas nas MSCs dos pacientes, clivam e inativam CXCL12 (219). A hipo-regulação de *VCAM1* e *CXCL12*, somada ao aumento potencial de enzimas responsáveis pela inativação de CXCL12, poderia diminuir a quimioatração de precursores hematopoéticos (como HSCs) pelas MSCs. De fato, o nicho osteoblástico diabético possui um maior número de HSCs em estado quiescente e em ciclo celular (148, 220).

Finalmente, *ADAMTS7* e *MMP16* foram reprimidos nas células diabéticas (Figura 24b). No entanto, não existe descrição dessas moléculas no contexto hemotopoético.

CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

▪ *Expressão absoluta*

Através da secreção de diversos fatores solúveis (citocinas e fatores de crescimento), MSCs modulam a função de diversas células do sistema imune e fornecem fatores tróficos importantes para a regeneração tecidual. Dada tal importância, realizamos uma análise da expressão absoluta de citocinas e fatores de crescimento nessas células (Figura 25).

Dentre os genes relacionados, o *IL6* esteve entre os cinco mais expressos. A pleiotrófica IL-6, expressa de maneira constitutiva por MSCs, é importante na hematopoese (221, 222), com função na manutenção de neutrófilos e plasmócitos de vida longa (223, 224). Dentre seus efeitos deletérios está a inibição da diferenciação de células dendríticas (225) e de células T (226). Em modelo experimental de artrite, a IL-6 produzida por MSCs é necessária para inibição da resposta inflamatória (227).

Descritas no trabalho pioneiro de expressão gênica das MSCs (228), as hematopoetinas IL-11 e IL-15 foram altamente expressas em nossa análise. IL-11 suporta a maturação de progenitores hematopoéticos (229-232), é secretada por MSCs (233) e contribui para a proliferação de eritroblastos de pacientes com neoplasia mieloproliferativa (234).

Em íntimo contato com certas células endoteliais, MSCs induzem angiogênese e diferenciação/proliferação de diversos progenitores, tornando-se extremamente importantes em processos regenerativos. Dentre os diversos fatores tróficos secretados por MSCs destaca-se o VEGF (*Vascular and Endothelial Growth Factor*) (235-238), PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) (238), FGF2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) (239, 240) e HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) (235, 237, 241, 242). Em nossa análise, todos apresentaram altos níveis de expressão absoluta.

Altamente expresso em nossas análises, o TGF- β 1 induz células T reguladoras e é essencial nos mecanismos imunorreguladores apresentados por MSCs (243-246). Com relação à hematopoese, TGF- β 1 inibe proliferação de progenitores hematopoéticos em humanos e murinos, *in vitro* (247-249). *In vivo*, é muito provável que a secreção dessa molécula por MSCs tenha efeito na maturação de HSCs (250). Membro da mesma família, indutor de ECM e outras moléculas de adesão, o TGF- β 3 (*TGFB3*) também foi expresso em altos níveis nas MSCs em nosso estudo.

INHBA codifica as cadeias formadoras da activina A, que age na hematopoese (251-253), na regulação da multipotencialidade, osteoblastogênese de precursores mesenquimais

(254, 255) e é potencializada em células estromais da medula óssea após contato com células T ativadas (256). Em co-cultura de MSCs e HSCs, a activina A regula a maturação de células B (257). BMP4 e BMP8b são moléculas envolvidas na osteogênese. A primeira participa ainda da regulação da hematopoese (258-262).

GAS6 (*Growth Arrest-Specific Gene-6*) é abundantemente exposto na medula óssea (263) e sua expressão por fibroblastos potencializa o crescimento de progenitores hematopoéticos (264). GAS6 esteve entre os cinco genes relacionados mais expressos.

Por fim, outros genes que codificam moléculas com funções não descritas em MSCs apresentaram alto valor de expressão absoluta: *TNFSF12* (TWEAK), *IL17D*, *GDF5*, *GDF11*, *NTF3*, *NRG1*, *EFNA4* e *EFNB1*.

Figura 25. Heatmaps da expressão absoluta de citocinas e fatores de crescimento por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.05$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em $\log_2$; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

▪ Expressão diferencial

Apenas duas moléculas de alto valor de expressão absoluta foram diferencialmente expressas, FGF3 e HGF. A expressão de ambas foi reprimida nas MSCs de pacientes diabéticos. O HGF possui inúmeros efeitos tróficos e suprime a proliferação de células T (100). Além do mais, é indispensável para reversão de esclerose múltipla experimental (265). Pertencente à família dos fatores de crescimento fibroblásticos, FGF3 possui funções desconhecidas em MSCs.

Produzido por certas populações de MSCs (266), IL-1Ra possui efeito anti-fibrótico e anti-inflamatório em modelo de injúria pulmonar (267). IL-1Ra é codificado pelo gene *IL1RN*, que teve baixa expressão absoluta ($EV < 120$) e foi induzido nas MSCs dos pacientes. O significado biológico dessa indução, além da relevância de IL-1Ra no contexto hematopoético, permanecem obscuros.

Figura 26. Heatmap da expressão relativa de citocinas e fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

O restante dos genes apresentados na Figura 26 apresentaram baixo EV e suas funções em MSCs permanecem desconhecidas.

RECEPTORES DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

▪ *Expressão absoluta*

Atualmente existe grande esforço na busca de marcadores específicos que possibilitem o isolamento de MSCs, mais similares às células encontradas *in vivo*. Com avanços nesse campo, aumentaremos nossa compreensão das funções fisiológicas desempenhadas pelas MSCs (93, 268).

A fim de termos uma melhor noção dos potenciais estímulos aos quais as MSCs estão “prontas” para responder, realizamos a análise da expressão absoluta de receptores de citocinas e fatores de crescimento (Figura 27). A expressão elevada de uma ampla variedade desses receptores, nos sugere grande sensibilidade aos estímulos presentes no microambiente medular por parte das MSCs.

Os receptores de hematopoetinas, IL4R e IL13RA1 que dimerizam e reconhecem a IL-4 e IL-13 foram os mais expressos. Pela promoção de células Th2 e produção de IgE, IL-4 e IL-13 são potentes indutores de resposta alérgica e imunidade contra parasitos intestinais (269, 270). MSCs inibem a inflamação alérgica (243, 271-273). É plausível que esse mecanismo seja dependente da sinalização através de IL-4R/IL13RA presente na superfície das MSCs.

MSCs expressaram os receptores de IL-11, IL-11R α (*IL11RA*) e *IL6ST* (gp130). IL-11 desempenha funções importantes durante a hematopoese (229, 230, 232, 274, 275). A expressão compartilhada de IL-11 (Figura 25) e IL-11R (Figura 27) por MSCs, sugere papel autócrino nessa via. No entanto, esses mecanismos permanecem desconhecidos.

Pertencente à família da IL-6, a OSM (*Oncostatin M*) também participa do processo de hematopoese (276). A expressão de OSM está diretamente relacionada com a retenção de progenitores hematopoéticos na medula óssea e se correlaciona com a produção de CXCL12 (277). A oncostatina M pode regular a expressão de CXCL12 em MSCs (278), assim como sua capacidade de proliferação e diferenciação (279-281). OSM sinaliza através de dois complexos, dentre eles, OSMR/IL6ST (282). OSMR apresentou alto valor de expressão absoluta em nossas análises.

A leptina também controla a diferenciação de progenitores mesenquimais (283). De acordo, seu receptor (*LEPR*) mostrou-se altamente expresso em nossa análise.

Figura 27. Heatmaps da expressão absoluta de receptores de citocinas e fatores de crescimento por células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 (EV > 120) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos (FC > 2; $p < 0.05$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em log₂; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Da família dos Interferons (IFN) e IL-10, as MSCs expressaram *IFNAR1* (receptor de interferon tipo 1), *IFNGR1* e *IFNGR2* (receptores de interferon- γ) e *IL10RB*. Interferon- α/β controlam a proliferação de certas MSCs (284).

A expressão de *IFNGR1* e *IFNGR2* está correlacionada com as diversas funções desempenhadas pelo seu ligante em MSCs. O IFN γ ativa, por mecanismo denominado licenciamento, a função imunossupressora e imunorreguladora das MSCs (89, 94-96, 285-288). A presença de IFN γ no microambiente sinaliza que existe resposta inflamatória. MSCs, por sua vez, aumentam a expressão de moléculas imunossupressoras e desempenham suas funções (90-92).

A superfamília do TNF é composta por moléculas com as mais variadas atividades. Dentre elas, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular programada (289). MSCs expressaram (EV > 120) 9 receptores dessa família. Dois receptores *decoy*, de função reguladora: *TNFRSF6B*, que compete por FasL/LIGHT e *TNFRSF11B* (OPG, *osteoprotegerin*) que compete por RANKL (290). A produção constitutiva de OPG por MSCs é responsável pela inibição da osteoclastogênese (291).

TNFRSF25 codifica o DR3, expresso, primariamente em células T e com propriedade coestimuladora (292-294). *TNFRS19* e *TNFRS21* também foram expressos nas MSCs, mas permanecem pouco caracterizados (295-297).

Fn14/TWEAKR, codificado pelo *TNFRSF12A* foi o receptor mais expresso dentre a superfamília do TNF. A expressão elevada de TWEAK (Figura 25), sugere papel autócrino da via Fn14-TWEAK, de função miogênica em progenitores mesenquimais (298).

TNFRSF10B (TRAILR) e *TNFRSF14* (LIGHTR) também mostraram expressão absoluta nas MSCs em nossas análises. LIGHT regula a adipogênese (299) e TRAIL está relacionado com a atividade migratória das MSCs (300).

O último membro altamente expresso foi o receptor TNFR1 (*TNFRSF1A*). Assim como discutido para o IFN γ , o licenciamento completo das MSCs é dependente da citocina inflamatória TNF (90-92, 96). Outra citocina que age em sinergismo com as demais nesse licenciamento é a IL-1 β (90, 96). *IL1R1* foi expresso em nossa análise (EV > 120).

Dentre as diversas interações com células do sistema imune inato (revisado por (160)), as MSCs apresentam a expressão de diversos TLRs (*Toll-like receptors*), responsáveis pelo controle de várias funções básicas nessas células (279, 301-304). *SIGIRR* (TIR8), da família da IL-1, é um importante regulador da sinalização via TLRs (305-307) e foi expresso em nossa análise. A relação entre TIR8 e MSCs ainda não foi explorada.

IL17RA e IL17RC heterodimerizam e viabilizam a atividade biológica da principal citocina da resposta Th17, a IL-17 (308). MSCs inibem as células Th17 (159, 309-311). A IL-17 recruta, induz proliferação, aumenta a motilidade e diferenciação das MSCs e está

correlacionada com a osteoclastogênese, *in vitro* e *in vivo* (312). Esses efeitos podem ser dependentes da sinalização via esses receptores.

Assim como a IL-17, TGF- β está relacionado com células Th17 (313). MSCs expressam *TGFB1* e *TGFB2* e esses receptores podem representar moduladores da indução de células Th17. TGF β induz diferenciação *in vitro* de MSCs em células musculares lisas (211, 314, 315).

É descrito que a activina A e BMP4 suportam a hematopoese (258, 260, 316, 317). Os receptores relacionados, ACVR1, ACVR1B, ACVR2A, ACVR2B e BMPR2 encontram-se expressos nas MSCs do nosso estudo. Como descrito anteriormente, a activina A regula a multipotencialidade de progenitores mesenquimais (254), que pode acontecer através de sinalização autócrina. A função de BMP4 em MSCs ainda não é descrita.

MSCs expressam FGFs (Figura 25). A sinalização via FGFRs regula a senescência e autorrenovação de diversas células (revisado por (318-320)). *FGFR1* e *FGFR2* foram expressos e podem ser importantes na manutenção da potencialidade das MSCs (321, 322).

EGF regula crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e tem sido frequentemente estudado no câncer (revisado por (323, 324)). EGF sinaliza via 4 receptores: EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3 e ERBB4 (325). Em nossa análise, as MSCs expressam *EGFR* e *ERBB2* (Figura 29), que provavelmente são responsáveis pela modulação da secreção de diversos fatores (326-328). A estimulação *in vitro* de MSCs com EGF induz proliferação (329).

As MSCs participam ativamente do processo de cicatrização por diversos mecanismos, dentre eles, pela indução da angiogênese (238). VEGF e PDGF, altamente expressos por MSCs em nossa análise (Figura 25), também modulam algumas propriedades das MSCs (330-332). Essa sinalização é restrita ao PDGFR, pois MSCs não expressam VEGFR (332, 333).

Dentre outros receptores, as MSCs apresentaram alta expressão de EPHA2, EPHB2 e EPHB3.

Os receptores de efrinas *EPHA2*, *EPHB2* e *EPHB3* apresentaram alto EV. As efrinas controlam o citoesqueleto, adesão, junções intercelulares, formato celular, movimento, proliferação, diferenciação, entre outros (revisado por (334)). Além dessas propriedades, as efrinas controlam algumas funções do sistema imunológico, homeostasia da glicose, remodelamento ósseo (revisado por (334)) e manutenção dos vasos sanguíneos (335). Em

MSCs, esses mecanismos ainda não são compreendidos, mas alguns estudos descreveram propriedades relacionadas (336, 337).

DDR1 e DDR2 ligam-se ao colágeno e reconhem, diretamente, componentes da ECM (338). São expressos numa variedade de tecidos e, mediante ativação, regulam adesão celular, proliferação e remodelamento da ECM (339). Ambos apresentaram expressão em MSCs. Em modelo de cultura 3D, eles foram essenciais para o remodelamento da ECM desempenhado pelas MSCs (340).

AXL e TYRO3 que codificam os receptores para GAS6, possuem papel desconhecido em MSCs. Os demais receptores altamente expressos (*CSF1R*, *TEK*, *ROR1* e *ROR2*, *PTK7* e *RYK*) ainda não foram correlacionados com MSCs.

Com base nessas análises de expressão gênica absoluta, podemos notar que MSCs, possuem alta expressão de muitos receptores com propriedades imunorreguladoras, caso dos receptores das citocinas pró-inflamatórias IFN γ , TNF e IL-1 β . Outros são relacionados aos fatores conhecidamente secretados pelas mesmas, caso do *FGFR*, *PDGF*, *TGFBR* e *ACVR*. Provavelmente, esses receptores reconhecem os estímulos do microambiente e modulam as mais diversas funções desempenhadas pelas MSCs, como a secreção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, seu potencial migratório, além de sua diferenciação em outras células de origem mesenquimal.

▪ *Expressão diferencial*

Como descrito anteriormente, a sinalização via *FGFR* age como mitógeno, fator de multipotência, inibidor da senescência e mantém o *pool* de progenitores durante a diferenciação, crescimento, homeostasia e reparo tecidual (318). Na análise de expressão diferencial, *FGFR1* mostrou-se reprimido em MSCs de pacientes diabéticos (Figura 28).

A via EGF/*EGFR* também está relacionada com proliferação e manutenção do potencial tronco (329, 341). MSCs de pacientes diabéticos apresentaram menor expressão de *EGFR*. Interessantemente, essa sinalização aumenta a secreção de diversos fatores angiogênicos, dentre eles, o HGF (326, 328, 329). Assim, a repressão de *EGFR* pode estar relacionada com a regulação negativa da expressão de HGF nas MSCs de pacientes diabéticos.

Figura 28. Heatmap da expressão relativa de receptores de citocinas e fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Outros 4 receptores apresentaram alta expressão absoluta e foram diferencialmente expressos (hiper-regulados) em MSCs de pacientes diabéticos: *TNFRSF14* (LIGHTR), *TNFRSF19* (TROY), *PTK7*, com papel na sinalização Wnt (342) e *EPHA2*, o receptor de efrina. O significado biológico desses resultados permanece desconhecido

Não existem trabalhos que demonstrem função dos outros receptores diferencialmente expressos, apresentados na Figura 28. Todos apresentaram baixo EV na análise anterior.

FATORES DE TRANSCRIÇÃO

A Figura 29 apresenta os fatores de transcrição com valor elevado de expressão absoluta e diferencialmente expressos entre os dois grupos. No entanto, nenhum deles possui função descrita em MSCs.

Figura 29. Heatmap da expressão absoluta (a) e relativa (b) dos fatores de transcrição diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

São mostrados apenas os genes diferencialmente expressos entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.05$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. (a) Os valores de expressão estão representados em log₂; azul indica alto valor de expressão. (b) Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

4.3.1.3.3 Análise DAVID

Após as análises de expressão gênica absoluta e diferencial, realizamos o agrupamento dos genes diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.05$) em categorias pré-definidas, para

identificar funções e vias diferencialmente reguladas em MSCs dos pacientes diabéticos. Para isso, utilizamos o DAVID database (135, 136).

De maneira isolada, realizamos o agrupamento funcional das sondas induzidas ou reprimidas ($FC > 2$; $p < 0.05$) para identificar funções e vias reguladas positiva ou negativamente, respectivamente, nas células dos pacientes.

▪ *Funções induzidas*

O enriquecimento funcional das sondas induzidas em MSCs de pacientes diabéticos demonstrou que os genes, em sua maioria, codificam proteínas presentes na membrana plasmática (Tabela 5).

Tabela 5. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Plasma membrane [§]	1,316369787	5,91E-11
Intrinsic to plasma membrane [§]	1,619798441	1,12E-09
Integral to plasma membrane [§]	1,586859956	1,40E-08
Plasma membrane part [§]	1,344730296	2,20E-06
Intrinsic to membrane [§]	1,167066214	6,99E-06
Integral to membrane [§]	1,155689484	8,71E-05
Synapse [§]	1,604789189	0,034677901
Extracellular region	1,200724901	0,074117565
Synapse part	1,642151243	0,126556766
Membrane fraction	1,267565256	0,395249221

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos. [§]Componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Dentre os processos biológicos induzidos, *G-protein coupled receptor protein signaling pathway* e *Cell surface receptor linked signal transduction* foram estatisticamente significativos (Tabela 6).

Tabela 6. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
G-protein coupled receptor protein signaling pathway [§]	1,497494978	4,33E-04
Cell surface receptor linked signal transduction [§]	1,353387232	6,04E-04
Cell-cell signaling	1,525580907	0,081122478
Neurological system process	1,328249377	0,1446913
Transmission of nerve impulse	1,672563786	0,12129453
Ion transport	1,427460333	0,104465118
Response to estrogen stimulus	2,33145255	0,124122478
Response to steroid hormone stimulus	1,884801993	0,191931839
Regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process	2,225477434	0,184871239
Regulation of nucleotide biosynthetic process	2,225477434	0,184871239

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos. [§]Processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Embora não tenham alcançado significância estatística, *Neurotransmitter receptor activity* e *Neurotransmitter binding* apareceram entre as funções moleculares enriquecidas. Os receptores de neurotransmissores sinalizam via proteína G. A função molecular *Bacterial binding* encontra-se no topo da lista e foi estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Bacterial binding [§]	9,380780347	0,017948993
Carbohydrate binding	1,695960289	0,059130702
Neurotransmitter receptor activity	2,369881351	0,145460271
Ion channel activity	1,583136876	0,146610378
Substrate specific channel activity	1,56234102	0,146108283
Channel activity	1,535273344	0,164246642
Passive transmembrane transporter activity	1,531555975	0,15121462
Glycosaminoglycan binding	1,991022767	0,150787022
Neurotransmitter binding	2,185812896	0,142885506
Anion:cation symporter activity	3,458352202	0,168603204

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas. [§]Função molecular significativa ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Por fim, nenhuma via canônica disponível no banco de dados KEGG foi estatisticamente significativa. *Neuroactive ligand-receptor interaction*, relacionada com a sinalização de neurotransmissores, ficou no topo da lista (Tabela 8).

Tabela 8. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Neuroactive ligand-receptor interaction	1,642540565	0,178684527
Tight junction	1,751435132	0,526229546
Antigen processing and presentation	2,0028962	0,407861918
Calcium signaling pathway	1,555725524	0,582810101
MAPK signaling pathway	1,428370787	0,515740127
Cyanoamino acid metabolism	5,587912088	0,560608309
Maturity onset diabetes of the young	2,738076923	0,61119605
Selenoamino acid metabolism	2,632766272	0,62801129
Long-term depression	1,842391304	0,597802632
Type II diabetes mellitus	2,080605565	0,564595373

São mostradas as dez primeiras vias canônicas enriquecidas.

▪ Funções reprimidas

Muitas das sondas reprimidas representam genes que condificam moléculas presentes no núcleo, nucléolo, nucleoplasma, entre outros (Tabela 9).

Tabela 9. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Organelle lumen [§]	1,602222872	3,33E-05
Membrane-enclosed lumen [§]	1,571145273	4,90E-05
Intracellular organelle lumen [§]	1,584510459	3,81E-05
Nuclear lumen [§]	1,642370526	6,70E-05
Nucleolus [§]	1,949600706	1,98E-04
Non-membrane-bounded organelle [§]	1,413465876	1,80E-04
Intracellular non-membrane-bounded organelle [§]	1,413465876	1,80E-04
Nucleoplasm [§]	1,625535639	0,014590944
Receptor complex	2,513832437	0,358097626
Ribonucleoprotein complex	1,557111743	0,46681806

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos. [§]Componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Processos biológicos envolvidos na regulação transcricional obtiveram valor estatístico dentre os reprimidos (Tabela 10).

Tabela 10. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Transcription [§]	1,644812365	5,50E-08
Regulation of RNA metabolic process [§]	1,708512251	3,01E-08
Regulation of transcription, DNA-dependent [§]	1,69951839	6,19E-08
Regulation of transcription [§]	1,531158038	1,15E-07
Negative regulation of cell differentiation	2,048632745	0,815173486
DNA replication	2,107165109	0,823340866
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process	1,540888562	0,927970192
Negative regulation of cellular component organization	2,225878636	0,91112239
Negative regulation of biosynthetic process	1,507744668	0,928287291
Mammary gland development	3,01023587	0,913885955

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos. [§]Processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Funções moleculares relacionadas com interação ao DNA também foram estatisticamente significativas, indicando um déficit na ativação transcricional (Tabela 11).

Tabela 11. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
DNA binding [§]	1,633425321	8,56E-10
Zinc ion binding [§]	1,458496988	6,46E-05
Transition metal ion binding [§]	1,374621369	2,88E-04
Metal ion binding [§]	1,221227007	0,017769688
Cation binding [§]	1,214808781	0,019936727
Double-stranded DNA binding [§]	3,217436558	0,024872365
Ion binding [§]	1,201955196	0,028065129
Structure-specific DNA binding	2,582824934	0,051461437
Transcription regulator activity	1,348542854	0,119634471
RNA polymerase II transcription factor activity	1,961229771	0,217321336

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas. [§]Funções moleculares significativas ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Novamente, nenhuma via canônica foi estatisticamente significativa, entretanto, *Focal adhesion*, *ECM-receptor interaction* e *Adherens junction* apareceram entre as dez principais (Figura 12).

Tabela 12. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Focal adhesion	2,420909805	0,066401271
ECM-receptor interaction	3,186090226	0,133623148
Cysteine and methionine metabolism	4,293554742	0,415794439
Adherens junction	2,843783011	0,359677459
Pathways in câncer	1,706077139	0,324589685
Regulation of actin cytoskeleton	1,923778792	0,281642015
Small cell lung câncer	2,606801094	0,340281438
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2,576132845	0,321862984
Dilated cardiomyopathy	2,380122738	0,410139749
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	2,561067741	0,388673814

São mostradas as dez primeiras vias enriquecidas.

4.3.1.3.4 *Gene set enrichment analysis (GSEA)*

Posteriormente utilizamos o software GSEA como estratégia adicional de agrupamento de genes em vias e funções diferencialmente reguladas entre células dos pacientes diabéticos e as controles saudáveis (133).

Dentre suas vantagens, compartilhada pelo DAVID, está a de que não analisamos os genes de forma isolada, que representa pouco dentro da complexidade biológica. Vale ressaltar que um aumento discreto da expressão de 20% em genes envolvidos em uma dada via pode resultar numa alteração metabólica mais significativa do que o aumento de 20 vezes em um único gene. Na análise DAVID, restringimos nossa lista de genes para $FC > 2$ e $p < 0.05$. Dessa forma, o efeito potencial daqueles genes que estão induzidos/reprimidos, com pequeno FC, é perdido. Essa limitação é contornada pela utilização do software GSEA..

Novamente, classificamos os genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$, independente do FC) dentre as seguintes categorias: *Gene Ontology* (componente celular, função molecular, processo biológico) e vias canônicas (*KEGG Pathway*). Os resultados foram muito similares aos observados na abordagem anterior.

Quanto à localização dos genes induzidos em MSCs de pacientes diabéticos, houve enriquecimento daqueles presentes na membrana plasmática, como visto na Tabela 13.

Tabela 13. Componentes celulares enriquecidos em MSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched cellular component	NES	NOM p value	FDR q value
Intrinsic to plasma membrane	2,361859	0	0
Integral to plasma membrane	2,3238463	0	0
Plasma membrane part	2,2763498	0	0
Plasma membrane	2,1477842	0	4,37E-04
Intrinsic to membrane	2,0639212	0	9,74E-04
Integral to membrane	2,0325365	0	0,001032498
Membrane part	1,933978	0	0,00251592
Extracellular space	1,8228317	0	0,006604015
Cell surfasse	1,6356857	0,024806201	0,029851155
Extracellular region	1,632564	0,005121639	0,027433937
Membrane fraction	1,5456711	0,011278195	0,048875146
Extracellular region part	1,4855534	0,032214765	0,067760915
Cell fraction	1,4447873	0,027577939	0,08226749

São mostrados apenas os componentes celulares que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Dentre os principais processos biológicos induzidos em MSCs de pacientes diabéticos, encontramos aqueles envolvidos com a sinalização via proteína G, segundos mensageiros, transmissão de impulso nervoso e transmissão sináptica (Tabela 14).

Tabela 14. Processos biológicos enriquecidos em MSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched biological process	NOM p \	FDR q \
Second messenger mediated signaling	2,492402 0	0
G protein-coupled receptor protein signaling pathway	2,4622278 0	0
G protein signaling-coupled to cyclic nucleotide second messenger	2,4527168 0	0
Neurological system process	2,3989553 0	0
Cyclic nucleotide mediated signaling	2,3913367 0	0
Cell cell signaling	2,3342955 0	1,50E-04
System process	2,2548969 0	2,41E-04
Transmission of nerve impulse	2,168762 0	0,00163079
Synaptic transmission	2,1141994 0	0,00288180
G protein signaling-coupled to cAMP nucleotide second messenger	2,099269 0	0,00284514
cAMP mediated signaling	2,0567353 0	0,00423870
Cell surface receptor linked signal transduction	2,043842 0	0,00437162
Multi organism process	1,9023215 0,001402525	0,01523591
Sensory perception	1,8900461 0,001457726	0,01627189
Response to other organism	1,8315382 0,003012048	0,02740948
Defense response	1,8172833 0,001312336	0,02873292
Response to wounding	1,815527 0	0,02747094
Tissue development	1,7416967 0,002828854	0,05070696
Wound healing	1,7032368 0,017160686	0,06865068
Sexual reproduction	1,6996316 0,010590015	0,06698658
Multicellular organismal development	1,692161 0	0,06835091
System development	1,6897537 0	0,06670271
Reproduction	1,6822433 0,004	0,06838462
Anatomical structure development	1,679146 0,001113586	0,06758555
Ion transport	1,6655262 0,015006822	0,07281015
Gamete generation	1,6317217 0,021770682	0,09010851
Regulation of body fluid levels	1,6279756 0,025993884	0,0893495
Organ development	1,612825 0,001177856	0,09662481
Signal transduction	1,6093737 0	0,0953737
Carbohydrate metabolic process	1,5763621 0,025537634	0,11856787
Positive regulation of multicellular organismal process	1,5505846 0,05648855	0,1382138
Nervous system development	1,5399104 0,010050251	0,14462458
Regulation of multicellular organismal process	1,5394858 0,033519555	0,1406089

São mostrados apenas os processos biológicos que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Nessa mesma linha, dentre as funções moleculares, destacam-se as envolvidas com os receptores acoplados à proteína G. Além disso, apareceram funções relacionadas com o transporte de íons e ligação a neurotransmissores (Tabela 15).

Tabela 15. Funções moleculares enriquecidas em MSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched molecular function	NES	NOM p value	FDR q value
G protein-coupled receptor activity	2,6104376	0	0
Transmembrane receptor activity	2,4704106	0	0
Rhodopsin like receptor activity	2,3226466	0	3,57E-04
Anion transmembrane transporter activity	2,2857964	0	4,94E-04
Receptor activity	2,2697737	0	3,95E-04
Substrate specific channel activity	2,1415114	0	0,001274282
Ion transmembrane transporter activity	2,0996914	0	0,001531819
Ion channel activity	2,0901916	0	0,001838123
Transmembrane transporter activity	2,074774	0	0,001633887
Substrate specific transmembrane transporter activity	2,057581	0	0,001666457
Substrate specific transporter activity	2,019808	0	0,002485661
Metal ion transmembrane transporter activity	1,9970127	0,001445087	0,002602674
Cation transmembrane transporter activity	1,9695055	0	0,003302859
Cation channel activity	1,9453349	0,001488095	0,004106117
Gated channel activity	1,9321121	0,003034901	0,004536441
Neurotransmitter binding	1,9208449	0,003100775	0,004841445
Carbohydrate binding	1,6375374	0,023703704	0,06591126
Pattern binding	1,5837017	0,029096479	0,0971247
Peptide binding	1,5647224	0,029154519	0,106112696
Active transmembrane transporter activity	1,5533259	0,027220631	0,108535305

São mostradas apenas as funções moleculares que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Como demonstrado nas análises anteriores, houve diferença de diversos genes que codificam citocinas e seus receptores (Figura 26 e 28). Vias disponíveis no banco KEGG relacionadas com tal sinalização, *JAK-STAT signaling pathway* e *Cytokine-cytokine receptor interaction* estiveram induzidas nas MSCs dos pacientes (Tabela 16).

Dentre as 3 primeiras vias canônicas de maior valor estatístico, apareceram *Neuroactive ligand receptor interaction* e *Calcium signaling pathway*. Ambas relacionadas com a sinalização de neurotransmissores. Após a ligação do neurotransmissor a seu cognato receptor, ocorre aumento de AMP cíclico e ativação de uma cascata de sinalização

intracelular, que culmina na abertura dos canais de cálcio. Como resultado, acontece ativação de diversos fatores de transcrição responsáveis pelo controle da expressão de um amplo número de genes (343). Esses achados corroboraram a hiper-estimulação simpática observada na medula óssea de modelo experimental de diabetes autoimune (148).

Tabela 16. Vias canônicas enriquecidas em MSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched pathway	NES	NOM p value	FDR q value
Olfactory transduction	3,202834	0	0
Neuroactive ligand receptor interaction	2,4616807	0	0
Calcium signaling pathway	1,9937912	0	0,008390457
JAK-STAT signaling pathway	1,8999532	0,001440922	0,019912673
Long term potentiation	1,8128328	0,00927357	0,03922356
Alzheimer's disease	1,6010733	0,014965987	0,21092764
Vascular smooth muscle contraction	1,5836767	0,029027576	0,20486423
Natural killer cell mediated cytotoxicity	1,5615855	0,039017342	0,20944388
Cytokine-cytokine receptor interaction	1,5417827	0,033379693	0,21150957
Long term depression	1,5077754	0,045655377	0,23586646

São mostradas apenas as vias canônicas (KEGG) que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

A **Figura 30** apresenta um *plot* da via “*Neuroactive ligand receptor interaction*”, gerado pelo software GSEA. Em verde, nota-se o *score* de enriquecimento, as linhas pretas na vertical representam a distribuição dos genes relacionados da via dentre os induzidos (faixa vermelha) ou reprimidos (faixa azul).

Figura 30. Perfil de enriquecimento da via *Neuroactive ligand receptor interaction*.

Muitos dos receptores envolvidos na via *Neuroactive ligand receptor interaction* foram regulados positivamente nas MSCs de pacientes diabéticos (Figura 31). Dentre eles, o gene *ADRB3*, que codifica o receptor β_3 adrenérgico. *ADRB3*, de fato, mostrou-se estatisticamente induzido nas células dos pacientes ($FC > 2$; $p < 0.05$). Esses resultados corroboram o trabalho de Ferraro e cols., no qual a hiperestimulação simpática observada na medula diabética era, justamente, mediada pelo $ADRB_3$ (148).

Figura 31. Heatmap da expressão relativa dos genes envolvidos na via *Neuroactive ligand receptor interaction*.

Azul representa menor e vermelho maior valor de expressão. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; n = 4) e indivíduos controles saudáveis (Control; n = 4).

4.3.1.3.5 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

▪ Sinalização via proteína G

O receptor $ADR\beta_3$ sinaliza, principalmente, via subunidades Gs/Gi da proteína G, que culmina na ativação da proteína quinase A (PKA). Analisamos a expressão das moléculas relacionados com a sinalização β_3 adrenérgica intracelular e encontramos diversos genes induzidos. Dentre eles, *PKA*, importante mediador *downstream* dessa sinalização (Figura 32).

Figura 32. Análise da sinalização de receptores acoplados à proteína G em células mesenquimais estromais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1.

Os genes hiper-regulados em MSCs de pacientes diabéticos estão representados em vermelho. Os verdes representam genes hiporregulados.

Esses resultados sugerem que MSCs de pacientes com T1D apresentam um perfil de expressão gênica que pode estar relacionado com uma hiperestimulação simpática, mediada pelo receptor $ADR\beta_3$. Esse fenótipo poderia explicar as alterações observadas na expressão de *CXCL12* e *VCAM1*. De fato, é descrito que pacientes com diabetes apresentam disregulação simpática (344, 345).

4.3.1.4 (D180 x T1D) Modulação da expressão gênica pelo AHSCT

4.3.1.4.1 Diferença do perfil de expressão gênica global

Um dos objetivos do presente trabalho foi descrever a modulação do AHSCT sobre a expressão gênica das MSCs. Na comparação D180 x T1D podemos identificar tais genes. Quase 400 sondas foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$; $FC > 2$). Dessas, 214 foram induzidas e 177 foram reprimidas após o transplante. Com $p < 0.01$, 52 sondas foram hiper-reguladas e apenas 5 foram hiporreguladas (Figura 33 e 34).

Figura 33. Volcano *plot* das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pré (T1D) e pós-AHSCT (D180).

Cada *plot* representa uma sonda. As sondas hiper-reguladas no grupo T1D encontram-se em vermelho e as hiporreguladas, em verde. A escala de significância é inversa à intensidade da cor. 57 sondas foram diferencialmente expressas após o transplante (D180 x T1D), das quais, 52 foram hiper-reguladas e apenas 5 foram hiporreguladas ($FC > 2$, $p < 0.01$, teste t, correção de Benjamini Hochberg).

Figura 34. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pré e pós-AHSCT ($FC > 2$, $p < 0.01$).

Quase a totalidade das sondas diferencialmente expressas estava hiper-regulada após o transplante. D-PRE: MSCs de pacientes diabéticos pré-AHSCT; D-POS: MSCs de pacientes diabéticos pós transplante. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

Para descrever a ontologia e funções desses genes, realizamos as mesmas ferramentas de bioinformática que nas análises anteriores (DAVID e GSEA).

4.3.1.4.2 *Análise DAVID*

- *Funções induzidas*

Dentre os componentes celulares enriquecidos com as sondas induzidas, muitos deles foram relacionados com a formação dos ribossomos. Desses, o componente celular *Ribonucleoprotein complex* foi estatisticamente significativo (Tabela 17).

Tabela 17. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Ribonucleoprotein complex [§]	3,228542111	0,028508658
Cytosolic ribosome	7,697681421	0,125614506
Ribosome	3,866742295	0,32097996
Cytosolic large ribosomal subunit	10,93881044	0,302375753
Ribosomal subunit	4,871189024	0,323284137
Cytosol	1,718955926	0,455104026
Cytosolic part	4,102053915	0,428595415
Intracellular non-membrane-bounded organelle	1,44109136	0,41544603
Non-membrane-bounded organelle	1,44109136	0,41544603
Organelle lumen	1,541651032	0,455770754

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos. [§]Componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

De acordo, na lista de processos biológicos, destacam-se aqueles envolvidos no processo traducional. No entanto, nenhum foi estatisticamente significativo (Tabela 17).

Tabela 18. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Translational elongation	6,466097644	0,588771072
Cellular macromolecular complex assembly	3,227239211	0,730325491
Cellular macromolecular complex subunit organization	2,874683667	0,863682055
Protein targeting to membrane	11,30867294	0,791455174
Regulation of ossification	5,980548187	0,905130833
Ribosome biogenesis	4,588355003	0,865642393
BMP signaling pathway	8,481504702	0,865177499
Ribonucleoprotein complex biogenesis	3,628199234	0,856113608
Positive regulation of cell proliferation	2,478893886	0,833851771
Hemopoiesis	3,162594974	0,803104756

São mostrados os dez primeiros processos biológicos enriquecidos.

O mesmo foi observado para as funções moleculares (Tabela 19), relacionadas com ligação ao RNA e constituição estrutural dos ribossomos.

Tabela 19. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
RNA binding	2,447211343	0,258552459
Structural constituent of ribosome	4,06735589	0,683038673
Transition metal ion binding	1,366982087	0,947779921
Single-stranded RNA binding	10,84628237	0,910081057
Fibronectin binding	27,89044039	0,988326859
Oxygen binding	6,810456373	0,977649263
Electron carrier activity	2,650222842	0,968641158
Rab GTPase activator activity	6,101033835	0,969042293
Heparin binding	3,790933645	0,95776555
Zinc ion binding	1,309438677	0,942392703
Small conjugating protein ligase activity	2,94025727	0,928548555

São mostradas as dez primeiras funções moleculares enriquecidas.

Dentre as vias canônicas induzidas após o AHSCT, a via *Ribosome* foi estatisticamente significativa (Tabela 20).

Tabela 20. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Ribosome ^{\$}	7,177858439	0,023858358
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	4,198142415	0,909571168
Focal adhesion	2,663000786	0,811122752
Dilated cardiomyopathy	3,878718535	0,767648249

^{\$}Vias canônicas (KEGG) significativas ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Antes do AHSCT, as MSCs de pacientes diabéticos apresentavam um fenótipo reprimido das funções relacionadas com transcrição. Esses dados demonstram que o tratamento foi capaz de induzir o processo posterior à transcrição, a síntese proteica.

▪ Funções reprimidas

Posteriormente, realizamos um enriquecimento das funções que foram reprimidas após o transplante. Nessa análise, o fenótipo não foi tão claro como o anterior.

Dentre os componentes celulares enriquecidos, nenhum foi estatisticamente significativo. Entretanto, a maioria foi pertencente à membrana plasmática (Tabela 21).

Tabela 21. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Plasma membrane	1,403191331	0,579440717
Integral to plasma membrane	1,74947305	0,815178974
Intrinsic to plasma membrane	1,710595871	0,752155936
Plasma membrane part	1,462314877	0,695614523
Apical plasma membrane	3,906718015	0,781587126
Cell junction	2,006152494	0,863017342
Integral to endoplasmic reticulum membrane	6,633108459	0,881170039
Apical part of cell	2,902756961	0,904088957

O mesmo foi observado para os processos biológicos. Nenhum obteve significância estatística. No topo da lista apareceu *G-protein coupled receptor protein signaling pathway*, induzido em MSCs pré-transplante (Tabela 22).

Tabela 22. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	2,095009485	0,911657312
Actin filament organization	8,169082126	0,777387551
Cell surface receptor linked signal transduction	1,647901049	0,96752886
Neurological system process	1,847157743	0,946845396
Actin filament bundle formation	16,80496894	0,921045865
Secondary metabolic process	5,956191524	0,99042145
Regulation of hormone levels	3,895191477	0,995247957
Sensory perception	1,887965647	0,992065302
Actin cytoskeleton organization	3,123047326	0,989402857
Nicotinamide nucleotide metabolic process	8,822608696	0,986716947

São mostrados os dez primeiros processos biológicos enriquecidos.

Dentre as oito funções moleculares hiporreguladas após o transplante, três delas desempenham funções relacionadas com canais iônicos (Tabela 23).

Tabela 23. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Cofactor binding	3,146413239	0,99956387
Acyl carrier activity	44,76896552	0,999322319
Ion channel activity	2,319635519	0,998074871
Substrate specific channel activity	2,24969676	0,995344415
Hormone binding	6,852392681	0,99136923
Channel activity	2,173250753	0,984412352
Passive transmembrane transporter activity	2,167988645	0,972793705
Cytokine receptor activity	6,104858934	0,974175515

Por último, a via canônica *Neuroactive ligand-receptor interaction* teve uma diferença de regulação de quase três vezes, contudo, não foi estatisticamente significativa (Tabela 24). Essa via também foi induzida em MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante.

Tabela 24. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Neuroactive ligand-receptor interaction	2,998231132	0,650379052
Axon guidance	3,718736288	0,786242191

Em conjunto, esses dados demonstram que as sondas reprimidas após o AHSCT foram, em parte, relacionadas com funções anteriormente induzidas em MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante.

4.3.1.4.3 *Gene set enrichment analysis (GSEA)*

Da mesma forma, realizamos um enriquecimento funcional através do software GSEA. Assim como evidenciado pelo DAVID, observamos, com significância estatística, que genes relacionados com a síntese proteica foram induzidos pelo transplante (Tabela 25, 26, 27 e 28).

Tabela 25. Componentes celulares enriquecidos após o AHSCT

Name of the enriched cellular component	NES	NOM p value	FDR q value
Perinuclear region of cytoplasm	1,8873553	0,003115265	0,09743552
Membrane bound vesicle	1,5295122	0,003496504	0,24678524

São mostrados apenas os componentes celulares que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Tabela 26. Processos biológicos enriquecidos após o AHSCT

Name of the enriched biological process	NES	NOM p value	FDR q value
Protein modification by small protein conjugation	2,1616144	0	0,00676185
Protein ubiquitination	2,0968928	0	0,009381288
Ubiquitin cycle	2,0700884	0	0,00989505
Regulation of organelle organization and biogenesis	1,8326538	0,002941177	0,12238784

São mostrados apenas os processos biológicos que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Tabela 27. Funções moleculares enriquecidas após o AHSCT

Name of the enriched molecular function	NES	NOM p value	FDR q value
Ubiquitin protein ligase activity	2,015854	0	0,039295018
Small conjugating protein ligase activity	1,9908721	0	0,025316233
Small protein conjugating enzyme activity	1,9606738	0	0,025170088
Acid amino acid ligase activity	1,8597888	0,003076923	0,047941558
Ligase activity forming carbon nitrogen bonds	1,6999668	0,003355705	0,13954207
mRNA binding	1,6976235	0,014005602	0,11783871
Chemokine activity	1,6637944	0,013927577	0,1301921
Chemokine receptor binding	1,6533047	0,010810811	0,12469724
GTPase binding	1,6383269	0,006097561	0,12579215
Ras GTPase activator activity	1,6265363	0,014662757	0,12116428
Cytokine activity	1,5871278	0,003267974	0,14674857
Ligase activity	1,5861404	0,003311258	0,13629508
G protein coupled receptor binding	1,5814475	0,01734104	0,13082285
Enzyme activator activity	1,5709251	0	0,13117278
Small GTPase binding	1,5631907	0,031976745	0,1283785
UDP glycosyltransferase activity	1,5111663	0,033426184	0,17266646
Protein C terminus binding	1,4467751	0,02970297	0,24266136
Enzyme regulator activity	1,4391527	0,005235602	0,24172692

São mostrados apenas as funções moleculares que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Tabela 28. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas após o AHSCT

Name of the enriched pathway	NES	NOM p value	FDR q value
Allograft rejection	2,0480974	0	0,011352732
Asthma	2,0167744	0	0,008777518
Autoimmune thyroid disease	1,8987142	0	0,019550966
Systemic lupus erythematosus	1,8628964	0	0,019688787
Type I diabetes mellitus	1,782865	0,005221932	0,030640982
Ribosome	1,6684548	0,00308642	0,06342289
Leishmania infection	1,5793532	0,003115265	0,108746484
Graft versus host disease	1,5629581	0,026239067	0,10637142
Viral myocarditis	1,4885734	0,031948883	0,15629555
Nod-like receptor signaling pathway	1,4316958	0,017964073	0,20637484

São mostrados apenas as vias canônicas que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Juntamente com a análise DAVID, esses resultados sugerem que MSCs de pacientes diabéticos, que possuem déficit de funções transcricionais, apresentam indução de genes de atividade traducional após o AHSCT.

4.3.1.5 (D180 x CTRLs) Fenótipo pós-transplante

Aparentemente, o AHSCT modulou, de forma discreta, a expressão gênica das MSCs pós-AHSCT. Dessa forma, investigamos as diferenças entre MSCs pós-transplante (D180) e controles e as correlacionamos com funções alteradas nas MSCs antes do transplante.

4.3.1.5.1 Diferença do perfil de expressão gênica global

Como demonstrado nas análises iniciais, MSCs D180 apresentaram um grande número de sondas diferencialmente expressas (1315 sondas para $p < 0.05$; $FC > 2$) das MSCs controles. Para $p < 0.01$, esse número foi próximo de 1000 (Figura 35). A maioria delas, 496 sondas, foi induzida nas células diabéticas (Figura 36), enquanto que 362 foram reprimidas ($FC > 2$, $p < 0.01$, teste t, correção de Benjamini Hochberg).

Figura 35. Volcano *plot* das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes tipo 1 pós-AHSCT (D180) e MSCs controles, não diabéticas (CTRL).

Cada *plot* representa uma sonda. As sondas hiper-reguladas no grupo D180 encontram-se em vermelho e as hiporreguladas, em verde. A escala de significância é inversa à intensidade da cor. 858 foram diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes pós-AHSCT e MSCs de controles (D180 x CTRL). 496 sondas foram hiper-reguladas e 362 foram hiporreguladas ($FC > 2$, $p < 0.01$, teste t, correção de Benjamini Hochberg).

Figura 36. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 pós-AHSCT e MSCs de indivíduos controles ($FC > 2$, $p < 0.01$).

A maior parte das sondas estava hiper-regulada no grupo D180. D-POS: MSCs de pacientes diabéticos pós-AHSCT; CTRL: MSCs coontroles, não diabéticas. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

4.3.1.5.2 *Análise DAVID*

▪ *Funções induzidas*

Com relação aos componentes celulares enriquecidos com as sondas hiper-reguladas nas MSCs D180, muitos foram relacionados com a membrana plasmática (Tabela 29).

Tabela 29. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Plasma membrane [§]	1,380384042	6,83E-05
Integral to membrane [§]	1,227699227	0,005328721
Intrinsic to membrane [§]	1,216282045	0,004946841
Intrinsic to plasma membrane [§]	1,61493755	0,005801701
Integral to plasma membrane [§]	1,580856075	0,012973601
Plasma membrane part [§]	1,374178751	0,020232688
Apical part of cell	2,505537587	0,098512299
Extracellular region	1,338779785	0,087043263
Axon	2,468112104	0,177779026
Cell projection part	2,036418504	0,316328867

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos. [§]Componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Dentre os processos biológicos, a sinalização via proteína G ficou no topo da lista e foi estatisticamente significativa (Tabela 30). O mesmo aconteceu em na comparação entre MSCs pré-transplante e controles. O segundo processo biológico da lista, *Cell surface receptor linked signal transduction*, também foi enriquecido em ambas as comparações com significância estatística (pré e pós-AHSCT).

Tabela 30. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
G-protein coupled receptor protein signaling pathway [§]	1,7777586	0,010801508
Cell surface receptor linked signal transduction [§]	1,557297205	0,007662122
Neurological system process [§]	1,674562202	0,021222667
Response to oxygen levels [§]	3,381260349	0,046353069
Positive regulation of cell motion [§]	3,9527106	0,049987709
Response to hypoxia	3,335525018	0,064051634
Response to endogenous stimulus	2,133637896	0,082726558
Response to steroid hormone stimulus	2,793502203	0,07568466
Cell-cell signaling	1,887165932	0,068553225

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos. [§]Processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Nenhuma função molecular enriquecida foi significativa. No entanto, a lista foi bem similar àquela da comparação MSCs T1D x MSCs CTRL (Tabela 31).

Tabela 31. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Carbohydrate binding	2,318067618	0,052536161
Polysaccharide binding	3,044882882	0,079790331
Pattern binding	3,044882882	0,079790331
Glycosaminoglycan binding	3,140035472	0,065289738
Channel activity	1,920604221	0,280057896
Bacterial binding	14,65349887	0,231498483
Passive transmembrane transporter activity	1,915953848	0,200774447
Substrate specific channel activity	1,914527491	0,208586597
Ion channel activity	1,822196751	0,437505288
Heme binding	2,664272522	0,466668988

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas.

Finalmente, dentre as vias canônicas, *Neuroactive ligand-receptor interaction* apareceu no topo da lista e foi seguida pela *Calcium signaling pathway*, induzida em MSCs pré-AHSCT (Tabela 32), como na primeira análise.

Tabela 32. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Neuroactive ligand-receptor interaction	2,040012669	0,500324809
Calcium signaling pathway	2,030251843	0,835674252
p53 signaling pathway	2,829491256	0,820608957
Olfactory transduction	1,522997932	0,865766271
TGF-beta signaling pathway	2,211556384	0,940583345
Long-term potentiation	2,425278219	0,915566679

▪ Funções reprimidas

Dentre as sondas reprimidas, houve enriquecimento de componentes relacionados com a matriz extracelular (Tabela 33).

Tabela 33. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Extracellular region part	1,537988174	0,975239822
Intracellular non-membrane-bounded organelle	1,267494546	0,923819846
Non-membrane-bounded organelle	1,267494546	0,923819846
Extracellular matrix	1,956397379	0,846466716
Chromosome	1,742416416	0,872740674
Proteinaceous extracellular matrix	1,845585809	0,932217946
Chromatin	2,109240924	0,928882003
Actin cytoskeleton	1,881850639	0,925647018
Extracellular space	1,478008239	0,907996845
Chromosomal part	1,639306418	0,938194729

São mostrados os dez primeiros componentes celulares enriquecidos.

Diferentemente da comparação T1D x CTRL, na qual os processos biológicos reprimidos foram envolvidos com transcrição, houve enriquecimento de processos relacionados com o processamento do colágeno, regulação do RNA, entre outros (Tabela 34).

Tabela 34. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Collagen metabolic process	7,792626728	0,835708978
Multicellular organismal macromolecule metabolic process	7,038501561	0,767742728
Regulation of RNA metabolic process	1,404076888	0,835121415
Multicellular organismal metabolic process	5,897122929	0,805768552
Regulation of transcription, DNA-dependent	1,394732214	0,77979826
DNA replication	2,488172043	0,878238104
Skeletal system development	2,051976944	0,870128165
Regulation of dendrite development	9,697491039	0,845968677
Protein maturation by peptide bond cleavage	3,382845711	0,879763132
Regulation of neuron differentiation	2,734254992	0,896263025

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos.

As funções moleculares reprimidas foram similares ao observado às observadas nas MSCs pré-transplante, relacionadas com a interação com o DNA (Tabela 35).

Tabela 35. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
DNA binding	1,403999567	0,216051003
Structure-specific DNA binding	2,728302608	0,868102412
Double-stranded DNA binding	2,966102179	0,968211908
Sequence-specific DNA binding	1,599716146	0,930987499
Actin monomer binding	13,48649584	0,888424495
Tumor necrosis factor binding	11,98799631	0,901039076
Metal ion binding	1,155364861	0,90479963
Cation binding	1,153188446	0,880304233
Zinc ion binding	1,213842984	0,939334015
Transition metal ion binding	1,188038413	0,920650543

São mostradas as dez primeiras funções moleculares enriquecidas.

O enriquecimento em vias canônicas apresentou duas vias presentes na análise pré-transplante, *Pathways in cancer* e *Focal adhesion* (Tabela 36).

Tabela 36. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Pathways in cancer	1,937881098	0,921058138
Prostate cancer	2,856741573	0,973740179
MAPK signaling pathway	1,745786517	0,983493695
Focal adhesion	1,89738806	0,959551323

Esses resultados demonstram que MSCs de pacientes diabéticos pós-transplante apresentam diferenças das MSCs controles similares às diferenças encontradas nas MSCs pré-transplante. Interessantemente, o déficit de funções relacionadas com a transcrição parece ter sido regulado pelo transplante, uma vez que essas funções não foram enriquecidas dentre as sondas reprimidas de MSCs dos pacientes diabéticos pós-transplante.

4.3.1.5.3 *Gene set enrichment analysis (GSEA)*

Da mesma forma, realizamos o enriquecimento funcional através do programa GSEA. Assim como demonstrado pela análise do DAVID, os componentes celulares enriquecidos em MSCs de pacientes diabéticos pós-transplante estiveram concentrados na membrana

plasmática (Tabela 37). Vale ressaltar que o resultado foi extremamente similar ao encontrado na comparação entre MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante e controles.

Tabela 37. Componentes celulares enriquecidos em MSCs de pacientes pós AHSCT

Name of the enriched cellular component	NES	NOM p value	FDR q value
Intrinsic to plasma membrane	2,4738941	0	0
Integral to plasma membrane	2,4695876	0	0
Plasma membrane part	2,3146422	0	0
Intrinsic to membrane	2,31251	0	0
Integral to membrane	2,2676651	0	0
Plasma membrane	2,1476617	0	2,22E-04
Membrane part	2,0616941	0	8,26E-04
Membrane	1,8137883	0	0,009094063
Membrane fraction	1,6529905	0,009983361	0,032638084
Extracellular space	1,4731156	0,052188553	0,101332515
Cell fraction	1,4593291	0,031772576	0,10090274

São mostrados apenas os componentes celulares que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Os processos biológicos (Tabela 38) e as funções moleculares (Tabela 39) enriquecidos estão, basicamente, envolvidos com sinalização via proteína G, similar ao observado em MSCs pré-AHSCT.

Tabela 38. Processos biológicos enriquecidos em MSCs de pacientes pós AHSCT

Name of the enriched biological process	NES	NOM p value	FDR q value
Cyclic nucleotide mediated signaling	2,20287	0	0,006697996
Neurological system process	2,2000496	0	0,003348998
Cell-cell signaling	2,1721091	0	0,003212701
G protein signaling-coupled to cyclic nucleotide second messenger	2,1295822	0	0,005298569
System process	2,1163876	0	0,004415998
G protein-coupled receptor protein signaling pathway	2,0847013	0	0,005336625
cAMP mediated signaling	1,9276105	0	0,024121968
G protein signaling-coupled to cAMP nucleotide second messenger	1,9160181	0,001748252	0,022717811
Sexual reproduction	1,8762021	0	0,030527724
Transmission of nerve impulse	1,8752131	0,005119454	0,027474953
Second messenger mediated signaling	1,8517635	0,003418803	0,03329764
Gamete generation	1,7600192	0,012567325	0,06568187
Synaptic transmission	1,7483095	0,009884679	0,06686035
Sensory perception	1,734093	0,014876033	0,07100802
Organ development	1,6375825	0,004651163	0,1346996
Cell surface receptor linked signal transduction	1,6143489	0,004431315	0,14982688
Anatomical structure development	1,6092445	0,001459854	0,1464229
Anatomical structure morphogenesis	1,5960146	0,006700167	0,15174164
Response to other organismo	1,5239685	0,0328152	0,23374589
Response to wounding	1,5185196	0,04819277	0,22961631
System development	1,5120645	0,011075949	0,22920513

São mostrados apenas os processos biológicos que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Tabela 39. Funções moleculares enriquecidas em MSCs de pacientes pós AHSCT

Name of the enriched molecular function	NES	NOM p value	FDR q value
G protein coupled-receptor activity	2,004019	0	0,027700262
Transmembrane receptor activity	1,9171045	0	0,042026665
Receptor activity	1,9086765	0	0,030363508
Ion transmembrane transporter activity	1,7321047	0,006420546	0,12072744
Transmembrane transporter activity	1,7237933	0,004731861	0,10460116
Substrate specific transmembrane transporter activity	1,6558009	0,004893964	0,13905251
Substrate specific transporter activity	1,6284457	0,0048	0,14475378
Rhodopsin-like receptor activity	1,5859647	0,03626943	0,17079373
Substrate specific channel activity	1,5152053	0,03960396	0,23924817
Metal ion transmembrane transporter activity	1,5066969	0,032478634	0,22677913
Cation transmembrane transporter activity	1,4933336	0,036605656	0,22395337

São mostradas apenas as funções moleculares que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

As quatro vias canônicas enriquecidas foram as mesmas que apresentaram maior relevância na análise T1D x CTRL (Tabela 40).

Tabela 40. Vias canônicas enriquecidas em MSCs de pacientes pós AHSCT

Name of the enriched pathway	NES	NOM p value	FDR q value
Olfactory transduction	3,0110624	0	0
Neuroactive ligand receptor interaction	1,8805158	0	0,03876765
JAK-STAT signaling pathway	1,8583887	0,00177305	0,032735188
Calcium signaling pathway	1,5020903	0,036458332	0,35199594

São mostradas apenas as vias canônicas (KEGG) que foram estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

4.3.1.5.4 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

▪ Sinalização via proteína G

Com base na significância estatística encontrada para as vias *Neuroactive ligand receptor interaction* e *Calcium signaling pathway* pós-AHSCT, fomos analisar a expressão do receptor $ADRB_3$ e sua via de sinalização. Interessantemente, o *ADRB3* não foi hiper-regulado pós-transplante, assim como sua via de sinalização intracelular (Figura 37).

Figura 37. Análise da sinalização de receptores acoplados à proteína G em células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes tipo 1 após o AHSCT.

Os genes hiper-regulados em MSCs de pacientes diabéticos após o AHSCT estão representados em vermelho. Os verdes representam genes hiporregulados.

Esses resultados demonstraram que a terapia de IAD/TACTH modulou algumas funções alteradas nas MSCs de pacientes diabéticos, principalmente com relação à sua capacidade transcricional. Paralelamente, o tratamento normalizou a expressão do *ADRB3* e a sinalização intracelular mediada pela proteína G. Apesar dessas mudanças, o perfil gênico das MSCs de pacientes diabéticos isoladas pós-transplante permaneceu muito similar ao das MSCs pré-transplante.

4.3.1.6 Caracterização das funções não moduladas pelo AHSCT

Como demonstrado anteriormente, o AHSCT modulou, discretamente, algumas funções das MSCs de pacientes diabéticos. Nesse cenário, caracterizamos as funções que permaneceram induzidas/reprimidas após o transplante.

4.3.1.6.1 *Sondas induzidas antes e após o AHSCT*

Quase um quarto das sondas que hiper-reguladas antes do transplante (537 sondas) permaneceu induzido após o AHSCT e foi equivalente à ~80% das sondas hiper-reguladas em MSCs pós transplante (Figura 38).

Figura 38. Diagrama de Venn do número de sondas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre MSCs de pacientes diabéticos e MSCs controles antes e após o AHSCT.

A intersecção das sondas hiper-reguladas em T1D x CTRL e D180 x CTRL menos a intersecção de D180 x CTRL hipo representa as sondas induzidas em MSCs de pacientes diabéticos que permaneceram hiper-reguladas mesmo após o AHSCT (537 sondas).

4.3.1.6.2 *Análise DAVID*

- *Funções induzidas*

O enriquecimento funcional demonstrou que as sondas induzidas estiveram relacionadas com moléculas de superfície celular (Tabela 41).

Tabela 41. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Plasma membrane [§]	1,413069869	1,04E-04
Intrinsic to plasma membrane [§]	1,734707994	0,003333506
Integral to plasma membrane [§]	1,688288022	0,007876588
Intrinsic to membrane [§]	1,227155298	0,007473868
Integral to membrane [§]	1,232202893	0,00700077
Plasma membrane part [§]	1,40422876	0,024950522
Extracellular region	1,386847677	0,065610104
Apical part of cell	2,278973018	0,503725938
Axon	2,351833266	0,50802626
Anchored to plasma membrane	6,180851064	0,580329223

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos. [§]Componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Dentre os processos biológicos enriquecidos, a sinalização via proteína G apareceu no topo da lista e foi seguida por *Cell surface receptor linked signal transduction* e *Neurological system process*, todos estatisticamente significativos (Tabela 42).

Tabela 42. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
G-protein coupled receptor protein signaling pathway [§]	2,041179381	2,32E-04
Cell surface receptor linked signal transduction [§]	1,599485153	0,018058088
Neurological system process [§]	1,770192837	0,017284126
Regulation of bone resorption	12,52592593	0,232943708
Regulation of bone remodeling	12,52592593	0,232943708
Sensory perception of chemical stimulus	2,043979544	0,327810646
Gas transport	10,4382716	0,310812632
Ion transport	1,761458333	0,300895392
Response to oxygen levels	3,198108747	0,285585371
Regulation of tissue remodeling	9,888888889	0,264979954

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos. [§]Processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

A função molecular *Carbohydrate binding* também foi estatisticamente significativa (Tabela 43).

Tabela 43. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Carbohydrate binding [§]	2,724439064	0,006420048
Polysaccharide binding	3,372207792	0,075406253
Pattern binding	3,372207792	0,075406253
Glycosaminoglycan binding	3,444469388	0,074857263
Bacterial binding	18,54714286	0,134899975
Channel activity	2,070797503	0,188928705
Passive transmembrane transporter activity	2,065783466	0,164806064
Substrate specific channel activity	2,050437904	0,19461242
Ion channel activity	2,018082902	0,254190104
Olfactory receptor activity	1,80737819	0,569445109

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas. [§]Função molecular significativa ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Por fim, dentre as vias canônicas, *Neuroactive ligand-receptor interaction* e *Calcium signaling pathway* foram, novamente, enriquecidas, porém não apresentaram significância estatística (Tabela 44).

Tabela 44. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Neuroactive ligand-receptor interaction	2,367808361	0,137891799
Calcium signaling pathway	2,296056592	0,562994951
Olfactory transduction	1,777071065	0,439813227
Taste transduction	3,238028528	0,860126522

Essas observações indicam que muitas das funções que permaneceram induzidas em MSCs de pacientes diabéticos após o AHST foram relacionadas com a sinalização mediada pela proteína G. Entretanto não sabemos se esse resultado está relacionado com uma suposta hiperestimulação simpática na medula óssea de pacientes diabéticos.

4.3.1.6.3 Sondas reprimidas antes e após o AHSCT

Em seguida, analisamos as características funcionais das sondas que permaneceram hiporreguladas. Mais de um terço das sondas hipoexpressas em MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante permaneceu reprimido após o AHSCT e foi equivalente a ~70% das sondas hiporreguladas em MSCs D180 (Figura 39).

Figura 39. Diagrama de Venn do número de sondas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.05$) entre MSCs de pacientes diabéticos e MSCs controles antes e após o AHSCT.

A intersecção das sondas hiporreguladas em T1D x CTRL e D180 x CTRL menos a intersecção de D180 x CTRL up representa as sondas reprimidas em MSCs de pacientes diabéticos que permaneceram hiporreguladas mesmo após o AHSCT (380 sondas).

4.3.1.6.4 Análise DAVID

▪ Funções reprimidas

O enriquecimento funcional das sondas reprimidas em MSCs de pacientes diabéticos antes e após o AHSCT, revelou que elas são relacionadas com moléculas que interagem fisicamente com o DNA (Tabela 45), muitos repressores e ativadores da transcrição.

Tabela 45. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Chromosome	1,92582867	0,999841138
Chromatin	2,531089109	0,996623728
Chromosomal part	1,967167701	0,983468509
Extracellular matrix	2,017534797	0,966199255
Intracellular non-membrane-bounded organelle	1,267494546	0,934930632
Non-membrane-bounded organelle	1,267494546	0,934930632
Nuclear lumen	1,396462957	0,898586109
Extracellular region part	1,516016914	0,865989057
Microtubule-based flagellum	8,253551442	0,843087096
Cytoplasmic membrane-bounded vesicle	1,725742574	0,81927931

São mostrados os dez primeiros componentes enriquecidos.

Da mesma forma, o agrupamento dessas sondas em processos biológicos demonstrou envolvimento com a regulação transcricional (Tabela 46).

Tabela 46. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Regulation of transcription, DNA-dependent	1,628538753	0,382020878
Regulation of transcription	1,480148256	0,245811975
Regulation of RNA metabolic process	1,592608499	0,241839292
Transcription	1,450647442	0,714917067
Negative regulation of cellular component organization	3,012414407	0,99716806
Nucleosome assembly	3,819311124	0,997018579
Protein maturation by peptide bond cleavage	3,730489935	0,99576531
Chromatin assembly	3,68761074	0,993269155
Regulation of actin cytoskeleton organization	3,604743083	0,992199306
Protein-DNA complex assembly	3,52551796	0,991409616

São mostrados os dez primeiros processos biológicos enriquecidos.

Dentre esses reguladores transcricionais, a maioria foi de proteínas com estrutura *zinc finger*. Dessa forma, as funções moleculares estiveram relacionadas com ligação ao DNA, interação com íons, em particular, com o zinco (Tabela 47).

Tabela 47. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
DNA binding ^{\$}	1,677624268	0,001254688
Structure-specific DNA binding	3,955490929	0,100618265
Double-stranded DNA binding	4,300252557	0,320635982
Cation binding	1,272633967	0,25885908
Transition metal ion binding	1,366700554	0,224518214
Metal ion binding	1,272028209	0,195645008
Ion binding	1,254029085	0,245837249
Zinc ion binding	1,3762762	0,304868243
Actin monomer binding	19,55271084	0,38065078
Tumor necrosis factor binding	17,38018742	0,421973258

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas. ^{\$}Função molecular significativa ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Por fim, duas vias canônicas relacionadas com o câncer foram enriquecidas (Tabela 48).

Tabela 48. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Prostate cancer	3,441857317	0,995715826
Pathways in cancer	1,867837202	0,982482047

Diante dos resultados dessas análises, podemos concluir que, embora haja uma certa normalização da atividade transcricional nas MSCs pós-transplante, muitas das funções que permanecem reprimidas estão envolvidas com a interação física com o DNA e relacionadas com diversos reguladores transcricionais.

4.3.1.7 Genes diferencialmente expressos das categorias pré-definidas após o AHST

Em nossa análise comparativa entre MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante e controles, ressaltamos algumas funções com maior relevância para as MSCs: moléculas de

adesão, quimiocinas e receptores de quimiocinas, metaloproteases, citocinas, fatores de crescimento e receptores. De maneira específica, fomos investigar a expressão dessas moléculas após o AHSCT.

Analizamos, pós-transplante (D180 x CTRL), a expressão das moléculas diferencialmente expressas entre MSCs de pacientes diabéticos pré-transplante e controles: i) moléculas induzidas/reprimidas pré-transplante que permaneceram induzidas/reprimidas pós-AHSCT (D180 x CTRL) e, sem diferença em D180 x T1D, foram consideradas **não moduladas**; ii) genes hiper/hiporregulados pré-transplante e sem diferença em D180 x CTRL e D180 x T1D foram considerados **atenuados** e por fim, iii) moléculas induzidas/reprimidas pré-AHSCT, com o mesmo padrão em D180 x T1D e sem diferença entre MSCs pós-AHSCT e controles, foram consideradas **moduladas**.

Em geral, assim como demonstrado nos primeiros resultados, o perfil de expressão gênica após o transplante foi **atenuado**, apresentando um padrão de expressão intermediário, entre células diabéticas pré-AHSCT e controles (Figura 40).

Dentre as moléculas de adesão, *CD86* e *LAMA3* foram atenuados. *VCAM1* e *SEMA4A* foram modulados a níveis equivalentes aos das MSCs controles. *ITGA7* não foi modulado, permanecendo reprimido tanto nas MSCs pré quanto pós-transplante.

Três das quatro quimiocinas foram atenuadas após o transplante (*CCL24*, *CXCL5* e *CCL2*). A exceção foi *CXCL12*, hiporregulada antes e depois do AHSCT. Da mesma forma, todas as metaloproteases foram atenuadas após o transplante, exceto uma, *ADAMTS7*.

Figura 40. Heatmap da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas (FC > 2; $p < 0.05$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 pré, pós transplante e de indivíduos controles.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa na comparação T1D x CTRL (FC > 2; $p < 0.05$). Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Dos dois fatores de crescimento diferencialmente expressos nas MSCs pré-AHSCT, *FGF3* foi atenuado e *HGF* permaneceu hiporregulado. Não houve modulação dos receptores de citocinas e fatores de crescimento *FGFR1*, *EGFR*, *TNFRSF14* e *TNFRSF19*. Por outro lado, *PTK7* e *EPHA2* foram atenuados.

Esses resultados sugerem que o AHSCT modula, parcialmente, o perfil de expressão gênica diferencial de MSCs de pacientes com T1D. De fato, a terapia não envolve depleção do estroma medular e é restrita ao *reset* dos componentes hematopoéticos da medula óssea. É plausível que essa modulação observada seja transitória, resultado da resposta das MSCs à imunossupressão em altas doses e/ou ao “novo” nicho medular, e não ao efeito curativo desse tratamento. A análise do perfil de expressão gênica das MSCs em períodos

pós-transplante mais tardios demonstrará se existe relação entre a reversão desse fenótipo “atenuado” e a recaída clínica observada nos pacientes diabéticos.

4.3.2 Células tronco hematopoéticas (HSCs)

Como descrito anteriormente, os *arrays* hibridizados com as amostras de RNA das HSCs passaram por um rigoroso processo de controle de qualidade e normalização. Todas os testes e figuras relacionados encontram-se em Apêndices e Anexos.

4.3.2.1 Agrupamento das amostras

A Figura 41 apresenta a dispersão espontânea de todas as amostras após normalização. As amostras de HSCs controles encontraram-se mais dispersas, entretanto, mais próximas entre si do que em relação às amostras dos pacientes diabéticos. As HSCs de pacientes diabéticos encontram-se próximas.

Figura 41. Dispersão espontânea das amostras dentre dois componentes principais (PCA) 2D, após normalização.

As amostras do mesmo grupo encontraram-se mais próximas, o que representa maior similaridade entre si. CTL = HSCs controles; D-PRE = HSCs de pacientes diabéticos.

4.3.2.2 Número de sondas diferencialmente expressas

Após as análises estatísticas, chegamos ao número de sondas diferencialmente expressas entre os dois grupos. Ao contrário do que observado para as MSCs, um $p < 0.05$ resultou

em quase 8 mil sondas diferencialmente expressas. Dessa forma, optamos por *p values* mais rigorosos: primeiro $p < 0.01$, depois $p < 0.005$. Na última condição, encontramos 2914 sondas diferencialmente expressas. Essa condição foi adotada em nossas análises posteriores.

A Tabela 49 apresenta o número de sondas diferentes encontrados nas três condições estatísticas analisadas.

Tabela 49. Número de sondas diferencialmente expressas nas HSCs de pacientes com T1D.

Estatística	T1D x CTRL
	Número de sondas
$p < 0.05$	7942
$p < 0.05$; $FC \geq 2$	6232
$p < 0.05$; $FC \geq 2$ [hiperreg]	2502
$p < 0.05$; $FC \leq (-2)$ [hipo-reg]	3730
$p < 0.01$	4209
$p < 0.01$; $FC \geq 2$	4119
$p < 0.01$; $FC \geq 2$ [hiperreg]	1404
$p < 0.01$; $FC \leq (-2)$ [hipo-reg]	2715
$p < 0.005$	2914
$p < 0.005$; $FC \geq 2$	2914
$p < 0.005$; $FC \geq 2$ [hiperreg]	948
$p < 0.005$; $FC \leq (-2)$ [hipo-reg]	1966

Número de sondas diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes diabéticos e HSCs controles, nas diferentes condições estatísticas (test t ajustado). T1D: HSCs de pacientes; CTRL: HSCs de doadores não diabéticos. Em vermelho, destacados as sondas hiper-reguladas e em verde, as hiporreguladas. O número de sondas é referente ao ao grupo T1D.

Dentre as 2914 sondas, 948 foram induzidas em HSCs de pacientes diabéticos e 1966 foram reprimidas (Figura 42).

Figura 42. Volcano plot das sondas diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes com diabetes tipo 1 (T1D) e HSCs de indivíduos não diabéticos (CTRL).

Cada plot representa uma sonda. As sondas hiper-reguladas em HSCs controles encontram-se em vermelho e as hiporreguladas, em verde. A escala de significância é inversa à intensidade da cor. 2914 foram diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes e HSCs de controles (T1D x CTRL), das quais, 948 foram hiper-reguladas em HSCs de pacientes diabéticos e 1966 foram hiporreguladas ($FC > 2$, $p < 0.005$, teste t, correção de Benjamini Hochberg).

A Figura 43 evidencia melhor o grande número de sondas reprimidas nas HSCs dos pacientes diabéticos.

Figura 43. Heatmap do agrupamento hierárquico supervisionado das sondas diferencialmente expressas entre HSCs de pacientes com diabetes tipo 1 e HSCs de indivíduos controles (FC > 2, $p < 0.005$).

A maior parte das sondas estava hiporregulada em HSCs de pacientes. D-PRE: HSCs de pacientes diabéticos; CTL: HSCs de indivíduos não diabéticos. A identificação dos grupos é seguida pelo código do indivíduo, número da lâmina e posição que se encontra.

4.3.2.3 Análise da expressão de categorias pré-definidas

Em seguida, realizamos as análises de expressão absoluta dos genes das mesmas categorias analisadas anteriormente para as MSCs (moléculas de adesão, quimiocinas e receptores, citocinas, fatores de crescimento, etc). Ainda, dentre essas categorias, descrevemos a expressão diferencial entre as HSCs de pacientes diabéticos e HSCs controles.

MOLÉCULAS DE ADESÃO

▪ *Expressão absoluta*

Diferentemente das MSCs, as HSCs não apresentaram alto valor de expressão absoluta de genes codificadores de colágeno (Figura 44a). Enquanto MSCs expressaram diversas classes de colágenos, com valores absolutos próximos a 15 (em log₂), HSCs limitaram-se à valores inferiores a 10, de poucas cadeias. COL18A1 foi a cadeia de colágeno mais expressa.

Figura 44. Heatmaps da expressão absoluta de Colágenos, Integrinas e Lamininas por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão de Colágenos, (b) Integrinas e (c) Lamininas. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em log₂; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; n = 4) e indivíduos controles saudáveis (Control; n = 4).

Da mesma forma, a expressão absoluta de outros constituintes da lâmina basal, as lamininas, foi inferior nas HSCs. Somente *LAMB2* e *LAMB3* apresentaram alto valor de expressão (EV > 120) (Figura 44c).

Por outro lado, HSCs expressaram diversas cadeias de integrinas (Figura 44b). Dentre essas, *ITGA4* (CD49d), *ITGA5* (CD49e) e *ITGB1* (CD29) que dimerizam e formam VLA-4 e VLA-5 (*Very Late Antigen*). VLA-4 e VLA-5 ligam-se, respectivamente, à VCAM-1 e fibronectina-1 (moléculas altamente expressas por MSCs, em nossa análise) e desempenham papel fundamental na adesão das HSCs (346). *ITGB2* (CD18) e *ITGAL* (CD11a) também apresentaram alto valor de expressão absoluta. Eles dimerizam e formam o LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*), o qual interage com ICAM-1.

Dentre as integrinas, *ITGB7* foi a mais expressa. Ela dimeriza com CD103 (*ITGAE*), a quarta cadeia mais expressa, ligam-se à E-caderina e são importantes para a migração de certos linfócitos para mucosas epiteliais (347). Entretanto, o papel dessas integrinas nas HSCs permanece desconhecido. Dentre todas as cadeias apresentadas na Figura 44c, somente *ITGB3*, *ITGA11* e *ITGA2* não apresentaram alto valor de expressão.

▪ *Expressão absoluta*

Dentre as moléculas de adesão diferencialmente expressas com alta expressão absoluta, quatro delas foram integrinas: *ITGA6* foi induzida e *ITGAX*, *ITGB4* e *ITGB5* foram reprimidas nas HSCs de pacientes diabéticos.

Figura 45. Heatmap da expressão relativa de moléculas de adesão diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Outras moléculas de alta expressão absoluta e expressão diferencial foram reprimidas em células diabéticas. Entre elas, as sialoadesinas, SIGLECs (*sialic acid binding Ig-like lectins*) 5, 7, 10 e 11, a laminina β_2 (*LAMB2*), *AGRN*, *SEMA4A*, *ICAM3*, *PVR*, *SELPLG*, *FGFR3*, *TGM2*, *SDC3* e *CD68*. O restante mostrado na Figura 45 apresenta baixo EV. Não existem trabalhos na literatura que correlacionem tais moléculas com alguma função em HSCs.

QUIMIOCINAS E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

▪ *Expressão absoluta*

HSCs apresentaram expressaram diversas quimiocinas (Figura 46a). CXCL4/PF4 (*Platelet factor 4*), produzida primariamente por megacariócitos e plaquetas (348), foi a mais expressa. PF4 regula negativamente a megacariopoeese (349, 350). De acordo com nosso resultado, progenitores hematopoéticos possuem expressão, a nível transcricional, dessa quimiocina (351).

CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), IL8 (CXCL8) estão entre as moléculas expressas (EV > 120). Em elegante trabalho, Majka e colaboradores observaram que células CD34⁺ isoladas da medula óssea expressam o RNAm de todas essas quimiocinas e mais, estão presentes no sobrenadante de seus meios condicionados (352). HSCs ainda expressaram CKLF, CCL18, CCL24, CXCL12, CCL3L3, CCL2, CXCL2, CCL23. Esses resultados demonstram que o precursor hematopoético (CD34⁺) pode secretar quimiocinas e, dessa forma, regular outros componentes do nicho hematopoético.

O receptor do CXCL12, CXCR4, essencial no desenvolvimento das HSCs (66, 353), foi o mais expresso dentre os receptores de quimiocinas. O CCR7, que precursores hematopoéticos utilizam para migração ao timo (354), foi o terceiro. Após serem transplantadas em animais irradiados, HSCs deficientes desse receptor enxertam a medula óssea mais eficientemente (355). Além desses, HSCs houve expressão de CXCR3, CCR1, CXCR1, CCRL2, CCR5 e XCR1 (Figura 46b).

Figura 46. Heatmaps da expressão de moléculas relacionadas à quimiotaxia por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão absoluta de moléculas e (b) receptores com atividade quimiotática. Azul indica alto valor de expressão. Os valores de expressão estão representados em log₂. (c) Análise da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células de pacientes e de indivíduos controles. Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

▪ Expressão diferencial

HSCs apresentaram repressão na expressão de duas quimiocinas (CCL18 e CXCL16) e de três receptores (CXCR3, CCRL2 e CXCR2) (Figura 46c).

Wimmer e colaboradores demonstraram que o CCL18 presente nas culturas de células da medula óssea estimula a hematopoese, por mecanismos dependentes de monócitos. Além disso, induzem a proliferação de células estromais (356).

O hiporregulado CXCR3 é utilizado por HSCs (CD34⁺) para migração ao fígado (357). Porém, a relevância desse achado no contexto do T1D permanece desconhecida. O mesmo é válido para a expressão diferencial de CXCR2 e CCRL2.

METALOPROTEASES

▪ Expressão absoluta

Com relação à expressão absoluta de metaloproteases e moléculas relacionadas, HSCs apresentaram um perfil menos diverso quando comparada às MSCs (Figura 47a). HSCs expressaram dez moléculas (*ADAM8*, *ADAMTS7*, *MMP19*, *MMP9*, *ADAM17*, *ADAMTS14*, *ADAM15*, *MMP11* e *MMP28*). Três das quais não foram compartilhadas por MSCs (*ADAM8*, *MMP9* e *MMP28*).

No contexto hematopoético, duas metaloproteínas são descritas, *MMP2* e *MMP9*. *MMP2* foi discutida anteriormente durante as análises das MSCs. Por mecanismo dependente da clivagem de SCF (*Stem Cell Factor*) transmembrânico, *MMP9* recruta e ativa progenitores hematopoéticos quiescentes (358).

Figura 47. Heatmaps da expressão de peptidases (MMPs e ADAMs) por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

(a) Análise da expressão absoluta. São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.005$). Azul indica alto valor de expressão. Os valores de expressão estão representados em log₂. (b) Análise da expressão relativa das moléculas diferencialmente expressas ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células de pacientes e de indivíduos controles. Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

- *Expressão diferencial*

Quatro metaloproteases foram diferencialmente expressas em HSCs de pacientes diabéticos (Figura 47b). *ADAMTSL4* e *ADAM28* foram induzidos, enquanto *MMP23B* e *ADAM15* foram reprimidos. Dessas, somente *ADAM15* apresentou alta expressão absoluta na análise anterior (Figura 47a). Nenhuma dessas moléculas é descrita em HSCs.

CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

- *Expressão absoluta*

HSCs apresentaram alto valor de expressão absoluta de citocinas de fatores de crescimento (Figura 48).

Dentre esses, encontramos a oncostatina M (OSM), que faz parte da família da IL-6 e age na regulação de outras citocinas. OSM suporta a sobrevivência de progenitores hematopoéticos na medula óssea (277) e regula a atividade das células estromais da medula óssea (276, 359). Em nossa análise, MSCs expressaram seu receptor, o *OSMR*. Oostendorp e colaboradores demonstraram que OSM regula a expressão kit-ligante que, por sua vez, mantém a capacidade proliferativa dos progenitores hematopoéticos (360). *IL23A* que codifica a subunidade p19 da IL-23 também apresentou valor elevado de expressão absoluta.

Dentre a superfamília do TNF, as HSCs expressaram *LTB*, *TNFSF4* (OX40L), *TNFSF12* (TWEAK), *TNFSF13* (APRIL) e *TNFSF13B* (BAFF). No entanto, não encontramos relação entre a expressão desses genes e as funções desempenhadas por HSCs.

Figura 48. Heatmaps da expressão absoluta de citocinas e fatores de crescimento por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.005$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em $\log_2$; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

Pertencente à família do TGF- β , o gene *BMP8B*, indutor de osteogênese, apresentou o maior valor de expressão absoluta dentre todas as citocinas e fatores de crescimento. *GDF11* (BMP-11) e *TGFB1* também foram altamente expressos. TGF- β 1 está presente no meio condicionado de HSCs ($CD34^+$) (352).

IL-1 β , expresso em progenitores hematopoéticos (352, 361-363) foi expresso em HSCs de pacientes diabéticos e controles em nossa análise. Juntamente com ele, os genes *IL18* e *IL17D*.

Ao contrário do grande número de membros da família do PDGF e VEGF que as MSCs expressaram, HSCs apresentaram alto valor de expressão somente de *VEGFB*, *PDGFC*, *FGF3* e *FGF13*.

Finalmente, HSCs expressaram efrinas, HGF, presentes em progenitores hematopoéticos (352, 364), *GAS6*, compartilhado pelas MSCs, *ANGPT1* (Angiopoetina-1) e *IGF2*.

Esses resultados sugerem que, diferentemente das MSCs que secretam diversos fatores de crescimento e citocinas e suportam a hematopoese, as HSCs limitam-se à expressão de poucos fatores tróficos para seu desenvolvimento e diferenciação.

RECEPTORES DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

▪ *Expressão absoluta*

HSCs (CD34⁺) apresentam uma expressão elevada de uma variedade enorme de receptores de citocinas e fatores de crescimento (Figura 49).

Houve alta expressão de *IL15R*, *IL6R* e *IL11R*. Respective receptores para as citocinas IL-15, IL-6 e IL-11, altamente expressas em MSCs em nossa análise. IL-6 e IL-11 possuem efeito sinérgico na expansão de progenitores hematopoéticos (365, 366), o que sugere interação entre essas duas populações celulares.

HSCs expressaram o *IL3R*. A IL-3 suporta a hematopoese (367, 368) e, juntamente com a eritropoetina, potencializa a eritropoese (369). O receptor da eritropoetina também foi altamente expresso pelas HSCs (*EPOR*). O mesmo foi observado para os receptores indutores da linhagem macrófágica e granulocítica, *CSF1R*, *CSF2RA* e *CSF3R*.

A tromboetina (TPO) é o principal regulador da produção de megacariócitos e plaquetas, via receptor c-MPL. Adicionalmente, TPO-MPL modula a proliferação e sobrevivência das HSCs e as mantém em estado quiescente (370-376). *MPL* foi altamente expresso nas HSCs em nossa análise de expressão absoluta.

IL-4R dimeriza com a cadeia gama do receptor de IL-2 (IL-2RG) ou com IL-13-RA1. Os genes que codificam tais receptores tiveram alta expressão absoluta em nossa análise. O dímero IL-4R/IL-13RA1 é o receptor de IL-4 e IL-13. Apesar de não ter sido bem relacionada na literatura, é provável que essa sinalização esteja envolvida na mielopoese (377-379). IL-4 e IL-13 estão relacionadas com a resposta inflamatória observada na asma. Interessantemente, Punia e cols. demonstraram que progenitores hematopoéticos são primados e potencializam a capacidade migratória mediante estímulo com essas citocinas. Eles sugeriram que essa via pode ter relevância clínica durante resposta inflamatória das vias aéreas, no recrutamento dessas células e potencialização da resposta inflamatória (380).

Dados recentes demonstram que HSCs expressam diversos receptores capazes de ativá-las durante uma resposta inflamatória (revisado por (61, 381)). Dentre esses, os receptores de interferons. Em nossa análise, HSCs expressaram *IFNAR1*, que codifica o

receptor dos interferons tipo I, *IFNGR1* e *IFNGR2*, receptores do IFN γ . De maneira geral, IFNs do tipo I induzem proliferação das HSCs quiescentes (382). IFN γ funciona da mesma forma (383-385).

A pleiotrópica IL-10 sinaliza através dos receptores IL-10RA e IL-10RB. Ambos apresentaram alta expressão em nossa análise de expressão absoluta. Além das suas propriedades imunorreguladoras em células do sistema imune, a IL-10 induz proliferação e autorrenovação de HSCs (386).

HSCs apresentaram expressão de diversos receptores pertencentes à superfamília do TNF. Dentre eles, o *TNFRSF12A* (Fn14) que codifica o receptor do TWEAK, altamente expresso por MSCs. Por essa via ocorre indução da proliferação de diversos progenitores mesenquimais (387). *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B* que codificam os receptores do TNF também tiveram alta expressão. Basicamente, o TNF possui efeito supressor em progenitores hematopoéticos (388). Todos os outros receptores membros da família do TNF presentes na Figura 49 apresentaram valor de expressão absoluta acima de 120.

Como esperávamos, as HSCs apresentaram alta expressão do gene *KIT*, que codifica o receptor tirosina quinase c-Kit (CD117), descrito há mais de duas décadas no contexto hematopoético (389, 390). c-Kit é o receptor de SCF, um dos principais fatores de crescimento responsável pela manutenção da hematose um dos principais fatores que suportam as HSCs (revisado por (391)). SCF é expresso por diversas células do estroma da medula óssea, entretanto, recentemente foi demonstrado que células endoteliais e uma subpopulação perivascular, Lepr⁺, compõem as principais fontes desse fator (392). O mesmo foi observado para o receptor FLT3 (também conhecido como FLK-2, STK-1). FLT3 liga-se ao FLT3L, que promove sobrevivência, proliferação dos progenitores hematopoéticos e é essencial para o desenvolvimento normal do sistema hematopoético (393-396).

Como mencionado anteriormente, GAS6 esteve entre as 5 moléculas mais expressas em MSCs. GAS6 sinaliza, principalmente, via receptor AXL, expresso por HSCs. Outros receptores membros dessa subfamília, *MERTK* e *TYRO3* foram expressos. Dormady e cols. demonstraram que progenitores hematopoéticos desenvolvem-se melhor em cultura que super-expressam GAS6 (264). Entretanto, nenhum estudo investigou se essa via possui relevância *in vivo*.

Figura 49. Heatmaps da expressão absoluta de receptores de citocinas e fatores de crescimento por células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles saudáveis.

São mostrados apenas os genes cuja expressão média absoluta foi maior que 120 ($EV > 120$) e/ou apresentaram ao menos uma sonda diferencialmente expressa entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.005$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Os valores de expressão estão representados em $\log_2$; azul indica alto valor de expressão. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) expresso por MSCs induz proliferação em HSCs (397, 398). De acordo, HSCs expressaram altos níveis de seus receptores, *FGFR1* e *FGFR3*.

Por mecanismos dependentes de G-CSF, IL-17 induz granulopoese (399, 400), entretanto, a sinalização direta em HSCs permanece desconhecida. Em nossa análise, as HSCs expressaram *IL17RA*, *IL17RC* e *IL17RE*.

Por fim, HSCs também expressaram (EV > 120) outros genes que codificam receptores de citocinas e fatores de crescimento. Os receptores de atividade regulatória da família da IL-1, *IL1R2* e *SIGIRR*, uma cadeia do receptor de TGF- β (*TGFBR2*), *AMHR2*, pertencente à mesma família, receptores de activina (*ACVRL1*, *ACVR1B*), receptores de efrinas (*EPHA1*, *EPHB4*, *EPHB6*), um dos receptores de angiopoetina (*TIE1*), além de outros receptores tirosina quinase (*ERBB2*, *NTRK1*, *LTK*, *DDR1*, *PTK7* e *RYK*).

Em contrapartida ao número limitado de citocinas e fatores de crescimento, HSCs apresentaram ampla expressão dos receptores relacionados. Esses dados sugerem que as HSCs estão “preparadas” para responder a diferentes estímulos: fatores de crescimento, manutenção e proliferação; moléculas indutoras de determinadas linhagens hematopoéticas; e citocinas pró e anti-inflamatórias.

CITOCINAS, RECEPTORES DE CITOCINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO

▪ *Expressão diferencial*

HSCs de pacientes diabéticos apresentaram 24 genes codificadores de citocinas, fatores de crescimento e receptores associados diferencialmente expressos em relação às HSCs controles ($p < 0.005$; FC > 2). Vinte e três foram hiporregulados, enquanto apenas um foi induzido (Figura 50). Desses, 16 apresentaram alto valor de expressão absoluta nos controles (*TIE1*, *IL1R2*, *IL10RA*, *IL15RA*, *PTK7*, *TNFSF12*, *LTBR*, *FGFR3*, *CSF2RA*, *AMHR2*, *IL17RC*, *TYRO3*, *TNFSF13*, *GAS6*, *NTRK1* e *AXL*) e foram hiporregulados nas células diabéticas.

Figura 50. Heatmap da expressão relativa de citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocinas e de fatores de crescimento diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células estromais mesenquimais de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. Pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

TNFSF12 (TWEAK), *TNFSF13* (APRIL) e *GAS6* foram as citocinas reprimidas. Pertencentes à família do TNF, TWEAK e APRIL apresentam funções desconhecidas na hematopoese. Como descrito anteriormente, o papel trófico de *GAS6* na hematopoese permanece limitado a um único trabalho realizado *in vitro* (264). *GAS* sinaliza via *AXL*, *TYRO3* e *MERTK*. *TYRO3* e *AXL* também apresentaram-se hipoexpressos nas HSCs dos pacientes.

Outros genes que codificam receptores de fatores que potencializam e mantêm a sobrevivência de HSCs (*IL-10RA* e *FGFR3*) e receptores indutores de linhagem macrófágica e granulocítica (*CSF2RA* e *IL17RC*) apresentaram menor expressão nas HSCs de pacientes diabéticos. Finalmente, os genes *TIE1*, *IL1R2*, *IL15RA*, *PTK7*, *LTBR*, *AMHR2* e *NTRK1*

também foram reprimidos, porém, estes não têm relação descrita no contexto hematopoético.

Esses resultados demonstram que HSCs dos pacientes diabéticos apresentam uma série de receptores de fatores de crescimento e citocinas hipoexpressos em relação às HSCs controles, muitos dos quais fornecem sinais de sobrevivência e manutenção. Os outros genes, com funções desconhecidas na hematopoese poderão ser investigados em estudos posteriores.

FATORES DE TRANSCRIÇÃO

▪ *Expressão diferencial*

Dentre os fatores de transcrição diferencialmente expressos nas HSCs dos pacientes com T1D, destacamos dois, *TCF4* e *TP53*.

Figura 51. Heatmap da expressão absoluta (a) e relativa (b) dos fatores de transcrição diferencialmente expressos ($FC > 2$; $p < 0.005$) entre células tronco hematopoéticas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos controles.

São mostrados apenas os genes diferencialmente expressos entre os dois grupos ($FC > 2$; $p < 0.005$). Genes com múltiplas sondas foram representados pelo valor de mediana. (a) Os valores de expressão estão representados em log₂; azul indica alto valor de expressão. (b) Verde representa menor e vermelho maior valor de expressão. Pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (Diabetic; $n = 4$) e indivíduos controles saudáveis (Control; $n = 4$).

O gene *TCF4* encontrou-se hiper-regulado em HSCs de pacientes diabéticos (Figura 51). Ele codifica o fator de transcrição também conhecido como TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2*) (401), importante regulador da via Wnt (402). A sinalização Wnt regula a hematopoese, de maneira dose-dependente (403, 404). O TCF7L2, de fato, está relacionado com a hematopoese (405). Polimorfismos em *TCF7L2* são frequentemente associados ao diabetes do tipo 2 (406-409), entretanto, os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos. No fígado, esse fator de transcrição regula o metabolismo da glicose, por mecanismos dependentes de CREB e FOXO1 (410).

A expressão do supressor tumoral, *TP53*, (411) apresentou-se diminuída nas HSCs dos pacientes diabéticos em nossas análises. Sob condições de stress, como dano ao DNA, entre outros, a célula rapidamente induz a expressão desse regulador transcricional. Mesmo em condições fisiológicas, p53 possui participação na regulação do ciclo celular. Em células tronco hematopoéticas, ele está relacionado com o estado de quiescência das células (412-416). A repressão de *TP53* sugere que as HSCs de pacientes diabéticos podem estar em um estado mais proliferativo do que HSCs controles.

O restante dos fatores de transcrição diferencialmente expresso é apresentado na Figura 51. Não existem dados na literatura que correlacionem esses genes com HSCs ou diabetes tipo 1.

4.3.2.4 Análise DAVID

▪ Funções induzidas

Da mesma maneira, realizamos o enriquecimento funcional das sondas induzidas em HSCs de pacientes diabéticos ($p < 0.005$; $FC > 2$).

Dentre os componentes celulares enriquecidos, a grande maioria das sondas era de genes codificadores de proteínas nucleares (Tabela 49).

Tabela 50. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Nuclear lumen	2,128492656	1,08E-11
Non-membrane-bounded organelle	1,738446392	2,72E-11
Intracellular non-membrane-bounded organelle	1,738446392	2,72E-11
Nucleoplasm	2,475865061	4,62E-11
Intracellular organelle lumen	1,89852506	2,88E-10
Organelle lumen	1,855756089	1,03E-09
Membrane-enclosed lumen	1,835448413	1,36E-09
Chromosome	2,785025255	1,13E-07
Microtubule cytoskeleton	2,545676338	2,95E-07
Microtubule organizing center	3,337426959	1,93E-06
Centrosome	3,509538724	2,03E-06
Nuclear body	3,986142749	2,34E-06
Cytosol	1,817024338	2,49E-06
Nucleolus	2,169113184	6,95E-06
Ribonucleoprotein complex	2,317986598	3,13E-05
Nucleoplasm part	2,255847647	3,07E-05
Chromosomal part	2,48920651	8,77E-05
Nuclear speck	4,240219387	2,46E-04
Spliceosome	3,529233106	9,98E-04
Cytoskeleton	1,581254876	0,001192894
Cell cortex	3,190813493	0,002855606
Spindle	3,169107278	0,002935596
Cytoskeletal part	1,68213185	0,002872801
Nuclear envelope	2,414511917	0,031519462
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex	8,56358033	0,036697649
Site of polarized growth	4,235079727	0,040157362

São mostrados apenas os componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Além disso, podemos notar que os processos biológicos foram relacionados com os processos de transcrição do DNA (Tabela 51).

Tabela 51. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiper-reguladas

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Transcription	1,748820374	1,22E-09
Regulation of transcription	1,596097553	2,98E-08
RNA splicing	3,36040937	3,76E-08
mRNA metabolic process	2,837275371	6,37E-07
mRNA processing	2,898745653	2,92E-06
RNA processing	2,311740486	8,91E-06
Chromosome organization	2,361293842	2,07E-05
DNA metabolic process	2,263295481	6,45E-05
Regulation of RNA metabolic process	1,552868709	1,62E-04
Negative regulation of macromolecule biosynthetic process	2,137269506	2,04E-04
Negative regulation of cellular biosynthetic process	2,083933012	3,80E-04
Establishment of RNA localization	4,181457845	4,45E-04
RNA transport	4,181457845	4,45E-04
Nucleic acid transport	4,181457845	4,45E-04
Negative regulation of gene expression	2,130259511	5,25E-04
Negative regulation of biosynthetic process	2,040290436	5,38E-04
RNA localization	4,056014109	5,38E-04
Negative regulation of transcription	2,183167917	5,24E-04
DNA replication	3,013756614	5,87E-04
Ribonucleoprotein complex assembly	4,840937556	5,73E-04
RNA splicing, via transesterification reactions	3,274751876	6,84E-04
Nuclear mRNA splicing, via spliceosome	3,274751876	6,84E-04
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	3,274751876	6,84E-04
Posttranscriptional regulation of gene expression	2,826884659	9,20E-04
Chromatin organization	2,272276812	9,50E-04
Cellular macromolecular complex assembly	2,400896254	0,0010671
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2,05037478	0,0010229
Protein modification by small protein conjugation or removal	3,131481481	0,00107
mRNA transport	4,113604573	0,0012156
Negative regulation of nitrogen compound metabolic process	2,022720399	0,001238
Regulation of transcription, DNA-dependent	1,480248008	0,0013577
Cellular macromolecular complex subunit organization	2,272276812	0,0013295
Negative regulation of macromolecule metabolic process	1,820298046	0,001334
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	3,589393017	0,0013393
Negative regulation of RNA metabolic process	2,240891773	0,0015749

Tabela 51. Continuação.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Chromatin modification	2,438136433	0,0022367
Protein modification by small protein conjugation	3,253487253	0,0023662
Negative regulation of transcription, DNA-dependent	2,211640212	0,0025375
Macromolecular complex assembly	1,829780801	0,0025284
Response to DNA damage stimulus	2,174806493	0,0024863
Protein targeting to membrane	6,506974507	0,0029084
Macromolecular complex subunit organization	1,781016966	0,0033004
Cellular response to stress	1,812602439	0,0125396
Spliceosome assembly	5,964726631	0,015905
Intracellular transport	1,706801532	0,0224157
DNA recombination	3,181187537	0,0221677
Protein ubiquitination	3,007425192	0,0224199

São mostrados apenas os processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

O enriquecimento das funções moleculares induzidas em HSCs de pacientes diabéticos demonstrou que esses genes possuem características de interação direta com o DNA e o RNA (Tabela 52).

Tabela 52. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
RNA binding	2,550469206	1,82E-11
DNA binding	1,692064578	1,31E-10
Zinc ion binding	1,655913263	1,47E-09
Transition metal ion binding	1,492100214	5,72E-07
mRNA binding	4,980053702	4,10E-04
Nucleotide binding	1,432696327	5,30E-04
Transcription repressor activity	2,303162268	0,002916219
Metal ion binding	1,230578487	0,010955873
Poly(A) RNA binding	14,67337251	0,013483624
Chromatin binding	2,817287523	0,013206095
Cation binding	1,219094266	0,014471575
Helicase activity	2,85082666	0,015196894
RNA polymerase II transcription factor activity	2,309252068	0,014125734
Poly-purine tract binding	13,04299779	0,015067456
ATP binding	1,414683985	0,024847779
Transcription factor binding	1,784831277	0,02345134
Ion binding	1,201272091	0,02292158
Single-stranded RNA binding	6,086732302	0,026890935
Adenyl ribonucleotide binding	1,395783731	0,028637839
Protein methyltransferase activity	4,225931284	0,034232134
Unfolded protein binding	2,858117777	0,03432188
Transcription regulator activity	1,381936671	0,034765674
Structure-specific DNA binding	2,590609216	0,034080593
Ubiquitin-protein ligase activity	2,555362832	0,037446924
Enzyme binding	1,705814625	0,040174504
Small conjugating protein ligase activity	2,404311641	0,044227347
Adenyl nucleotide binding	1,354751451	0,044732924
Purine nucleoside binding	1,349107079	0,044672224
GTPase binding	2,800056406	0,047252355
Ribonucleotide binding	1,317087032	0,047145901
Purine ribonucleotide binding	1,317087032	0,047145901

São mostradas apenas as funções moleculares significativas ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

A via canônica “*Spliceosome*” foi estatisticamente significativa e está relacionada com o processamento do RNA mensageiro após a transcrição (Tabela 53). Embora não tenha sido significativa, a via “*Cell cycle*” apareceu em terceiro lugar, o mesmo ocorreu com

a via “*Wnt signaling pathway*”, regulada pelo fator TCF7L2, induzido nas HSCs de pacientes diabéticos conforme mencionado e discutido anteriormente (Figura 51).

Tabela 53. Vias canônicas (KEGG) enriquecidas dentre as sondas hiper-reguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Spliceosome ^s	3,323529412	0,030571351
Prostate cancer	3,360872439	0,150661213
Cell cycle	2,871529412	0,108817922
Non-homologous end-joining	9,20361991	0,225187817
RNA degradation	3,673374613	0,243239896
Wnt signaling pathway	2,377093884	0,211936405
Regulation of actin cytoskeleton	2,086867305	0,190307122
Ubiquitin mediated proteolysis	2,401674538	0,214466479
mTOR signaling pathway	3,451357466	0,329931203
Long-term potentiation	2,639273356	0,622798698

São mostradas as dez primeiras vias canônicas enriquecidas. ^sVia canônica significativa ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

▪ *Funções reprimidas*

Após enriquecimento funcional, observamos que a mitocôndria obteve destaque entre os componentes celulares enriquecidos com as sondas reprimidas (Tabela 54).

Tabela 54. Componentes celulares enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Mitochondrion	1,619907851	7,44E-08
Organelle membrane	1,500143865	3,53E-05
Endoplasmic reticulum	1,469576418	6,56E-04
Lysosome	2,111439303	7,53E-04
Lytic vacuole	2,111439303	7,53E-04
Intrinsic to organelle membrane	2,25227079	0,003557979
Vacuole	1,894190871	0,003806295
Organelle envelope	1,522685049	0,004165137
Envelope	1,517788955	0,004194883
Golgi apparatus	1,423249838	0,00389774
Integral to organelle membrane	2,328468778	0,003554879
Mitochondrial inner membrane	1,733246549	0,00746619
Cytosol	1,307988644	0,008213272
Mitochondrial envelope	1,594917755	0,008897384
Endomembrane system	1,397147436	0,014710945
Organelle inner membrane	1,644318884	0,016772428
Mitochondrial part	1,444041982	0,022003554
Mitochondrial membrane	1,561505571	0,021402124
Cell fraction	1,292877093	0,039430882
Perinuclear region of cytoplasm	1,620585523	0,045238408
Endosome	1,582701706	0,047625833

São mostrados apenas os componentes celulares significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Dentre os processos biológicos relacionados, muitos foram envolvidos com metabolismo (Tabela 55). “*Oxidation reduction*” e “*Lipid biosynthetic process*” foram estatisticamente significativos.

Tabela 55. Processos biológicos enriquecidos dentre as sondas hiporreguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Oxidation reduction [§]	1,774166172	2,27E-05
Lipid biosynthetic process [§]	1,957434706	0,001642266
Glycoprotein metabolic process	1,996697011	0,082456582
Monosaccharide metabolic process	1,915020581	0,095478165
Mitochondrion organization	2,132782118	0,182006654
Hexose metabolic process	1,930365297	0,15555544
Cofactor metabolic process	1,900667369	0,176090349
Cofactor biosynthetic process	2,359985712	0,166548052
Glycoprotein biosynthetic process	2,000795602	0,172755288

São mostrados os dez primeiros processos enriquecidos. [§]Processos biológicos significativos ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

As funções moleculares enriquecidas foram relacionadas, principalmente, com coenzimas e cofatores (Tabela 56). Característica essa, marcante de enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos.

Tabela 56. Funções moleculares enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Purine nucleotide binding	1,257857823	0,174333227
Cofactor binding	1,802612351	0,203057968
Purine ribonucleotide binding	1,240695078	0,199196245
Ribonucleotide binding	1,240695078	0,199196245
Iron ion binding	1,675902749	0,181438855
Nucleotide binding	1,194602045	0,279396188
Coenzyme binding	1,797881738	0,443284777
Oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors, NAD or NADP as acceptor	4,363824066	0,482727318
Iron-sulfur cluster binding	2,693102852	0,464649351
Metal cluster binding	2,693102852	0,464649351

São mostradas as dez primeiras funções moleculares enriquecidas.

Por fim, dentre as vias canônicas reprimidas em HSCs de pacientes diabéticos observamos relação com o metabolismo de carboidratos, “*Amino sugar and nucleotide sugar*

metabolism” e “*Fructose and mannose metabolism*”, estatisticamente significativas. Além de “*Glycosphingolipid biosynthesis*” e “*N-Glycan biosynthesis*” (Tabela 57).

Tabela 57. Vias canônicas enriquecidas dentre as sondas hiporreguladas.

Term	Fold Enrichment	Benjamini
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism ^{\$}	3,800114296	5,28E-04
Lysosome ^{\$}	2,353816396	0,002718302
Fructose and mannose metabolism ^{\$}	3,760666743	0,004435292
Bladder cancer	2,575987842	0,308762242
Glycosphingolipid biosynthesis	4,215252832	0,307061831
N-Glycan biosynthesis	2,351988899	0,377266769
Insulin signaling pathway	1,675693101	0,356866786
Cyanoamino acid metabolism	5,62033711	0,469595244
Pyrimidine metabolism	1,656520411	0,687135827
RNA polymerase	2,458897485	0,673739755

São mostradas as dez primeiras vias enriquecidas. ^{\$}Via canônica significativa ($p < 0.05$; após correção de Benjamini).

Esses resultados indicam que o metabolismo de carboidratos (não apenas glicose) pode estar reprimido em HSCs de pacientes diabéticos.

4.3.2.5 Gene set enrichment analysis (GSEA)

Como observado pela análise anterior, o enriquecimento funcional através do software GSEA revelou que os componentes celulares enriquecidos em HSCs de pacientes diabéticos concentraram-se no núcleo (Figura 58).

Tabela 58. Componentes celulares enriquecidos em HSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched cellular component	NES	NOM p value	FDR q value
Nucleus	2,3321025	0	0,010278573
Nuclear part	2,0249898	0	0,04007134
Ribonucleoprotein complex	1,9051571	0,007228916	0,04936646
Microtubule cytoskeleton	1,8105199	0,015345269	0,06754914
Cytoskeletal part	1,7041225	0,026548672	0,1022453
Nucleoplasm	1,6752546	0,017291067	0,104048304
Membrane enclosed lumen	1,6378483	0,01607717	0,10905504
Organelle lumen	1,6025577	0,025806451	0,11682157
Nuclear lumen	1,5535601	0,03539823	0,13973902
Organelle part	1,4808143	0,028	0,1853658
Intracellular organelle part	1,4539379	0,008403362	0,1939564

São mostrados apenas os componentes celulares que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Dentre os processos biológicos, houve enriquecimento de processos relacionados com a transcrição e ciclo celular (Tabela 59).

Tabela 59. Processos biológicos enriquecidos em HSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched biological process	NES	NOM p value	FDR q value
Protein RNA complex assembly	2,8511515	0	0
Ribonucleoprotein complex biogenesis and assembly	2,5583377	0	0,00142623
RNA processing	2,4117594	0	0,004598329
RNA splicing	2,369025	0	0,00378859
Chromosome organization and biogenesis	2,2307513	0	0,008880857
RNA metabolic process	2,08699	0	0,024450002
Macromolecular complex assembly	1,9321631	0	0,058275834
Regulation of cellular component organization and biogenesis	1,927204	0,010025063	0,0519528
Cellular component assembly	1,9192146	0,00286533	0,04753799
Establishment and/or maintenance of chromatin architecture	1,8930942	0,00530504	0,053214278
Negative regulation of transcription	1,822608	0,016997168	0,07611866
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,8215643	0,003921569	0,070018806
Cell cycle process	1,819913	0,008086253	0,065498866
Regulation of gene expression	1,7221546	0,009771987	0,11109492
Negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,7053024	0,016949153	0,112468556
Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,7024375	0,00974026	0,10703628
Regulation of cellular metabolic process	1,68629	0	0,10875319
Regulation of transcription	1,6641905	0,01577287	0,11600629
Regulation of metabolic process	1,6591088	0,012987013	0,11274785
Negative regulation of cellular metabolic process	1,6372389	0,03561644	0,1209944
Negative regulation of metabolic process	1,6305664	0,03409091	0,11927239
Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,5882276	0,044386424	0,14204645
Regulation of transcription DNA dependent	1,5658082	0,028125	0,14636992
Regulation of RNA metabolic process	1,5229167	0,028391168	0,167187
RNA biosynthetic process	1,4725584	0,03642384	0,19294132
Transcription DNA dependent	1,4523351	0,038596492	0,20679964
Biopolymer metabolic process	1,4241993	0,02347418	0,20527266

São mostrados apenas os processos biológicos que foram estatisticamente significativos (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Além disso, houve enriquecimento de funções moleculares relacionadas com a ligação ao DNA e RNA (Tabela 60).

Tabela 60. Funções moleculares enriquecidas em HSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched molecular function	NES	NOM p value	FDR q value
RNA binding [§]	2,7236621	0	0
Enzyme binding [§]	1,9129438	0,00265252	0,09393323
Structure specific dna binding [§]	1,8449664	0,017326733	0,09173086
DNA binding [§]	1,7964727	0	0,09254399
ATPase activity [§]	1,7699655	0,007518797	0,08648886
Transcription repressor activity	1,4160215	0,1010929	0,48730063
Protein dimerization activity	1,3882102	0,10761155	0,47042036
Transcription factor binding	1,3644729	0,123595506	0,45614353
RNA polymerase II transcription factor activity	1,3172938	0,12947658	0,49852738
Enzyme activator activity	1,2350975	0,18372704	0,6310697

São mostradas as dez primeiras funções enriquecidas. [§]Funções moleculares estatisticamente significativas (NOM *p value* < 0.05 e FDR < 0.25). NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

“*Spliceosome*” e “*Cell cycle*” apresentaram-se no topo da lista das vias canônicas, entretanto não foram estatisticamente significativas (Tabela 61).

Tabela 61. Vias canônicas enriquecidas em HSCs de pacientes com T1D.

Name of the enriched pathway	NES	NOM p value	FDR q value
Spliceosome	1,7547455	0,020151133	0,25161543
Cell cycle	1,5490395	0,051282052	0,37997496
Prostate cancer	1,3159853	0,14357683	0,69876313
Wnt signaling pathway	1,193088	0,24303797	0,83876324
Axon guidance	0,9814654	0,4568528	1
Regulation of actin cytoskeleton	0,96547484	0,48228884	1
Tight junction	0,9341192	0,50970876	1
Calcium signaling pathway	0,8654384	0,63446474	1
Huntingtons disease	0,8316459	0,6768448	1
Neurotrophin signaling pathway	0,8294798	0,68266666	0,95637006

São mostradas as dez primeiras vias canônicas enriquecidas. NOM *p value*: valor de *p* nominal; FDR: taxa de falsa descoberta.

Juntamente com o que foi observado no DAVID, esses resultados sugerem que HSCs de pacientes diabéticos estão com o processo de transcrição ativado, que pode estar

relacionado com a ativação do ciclo celular. Esse fenótipo foi observado em progenitores hematopoéticos presentes na medula óssea em modelo de diabetes autoimune (148, 220).

Intrigantemente, os resultados de expressão diferencial dos receptores de fatores de crescimento e citocinas não revelou a possível via pela qual as HSCs dos pacientes diabéticos podem estar sendo ativadas. A hiperregulação de TCF7L2, ativador da via Wnt, assim como a hiporregulação do supressor tumoral, p53, apresentam possíveis caminhos pelos quais essa ativação possa ocorrer.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. Células estromais mesenquimais (MSCs) isoladas da medula óssea de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1 (T1D) apresentaram características morfológicas, imunofenóticas e potencial de diferenciação similares às das MSCs isoladas de indivíduos saudáveis;
2. MSCs isoladas da medula óssea de pacientes com T1D e de indivíduos saudáveis apresentaram altos níveis de expressão absoluta de diversas moléculas de adesão, metaloproteases, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocinas e fatores de crescimento, potencialmente relacionados com suas funções no sistema linfo-hematopoético, já descritas na literatura;
3. MSCs de pacientes com T1D apresentaram perfil de expressão gênica global distinto das MSCs isoladas de indivíduos saudáveis. Dentre as principais diferenças observadas, está a hiper-regulação de genes relacionados com a sinalização via proteína G e neurotransmissores. Além disso, as MSCs de pacientes com T1D apresentaram hiper-regulação do gene *ADRB3*, que codifica o receptor β_3 adrenérgico, e hiporregulação de genes relacionados com a atividade transcricional e suporte ao nicho hematopoético, tais como VCAM-1 e CXCL12;
4. MSCs isoladas de pacientes diabéticos após o tratamento com imunossupressão em altas doses (IAD) seguida pelo transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (AHSCT), apresentaram perfil de expressão gênica mais similar ao das MSCs de pacientes diabéticos do que das MSCs controles. Após o tratamento, houve atenuação da expressão da maioria dos genes diferencialmente expressos pré-transplante, entretanto, as MSCs permaneceram com a hiper-regulação da sinalização mediada pela proteína G e hiporregulação de alguns genes associados com a atividade transcricional das células;
5. Células tronco hematopoéticas (HSCs) isoladas da medula óssea de pacientes com T1D e de indivíduos saudáveis apresentaram altos níveis de expressão absoluta de diversas integrinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento, potencialmente relacionados com funções na hematopoese, já descritas na literatura;
6. HSCs de pacientes com T1D apresentaram perfil de expressão gênica global distinto das HSCs isoladas de indivíduos saudáveis. Dentre as principais diferenças, ressaltamos a hiper-regulação de genes associados com a atividade transcricional nas HSCs dos

pacientes diabéticos. Os fatores de transcrição TCFL2 e p53, que têm papel fundamental na regulação do ciclo celular das HSCs, foram diferencialmente expressos entre as HSCs dos pacientes diabéticos e controles. Em conjunto, esses resultados sugerem um estado de hiperativação do ciclo celular nas HSCs de pacientes com T1D;

7. Em resumo, nossos resultados de expressão gênica global apontaram alterações intrínsecas nas HSCs e MSCs de pacientes diabéticos que podem estar relacionadas com a falha terapêutica dos transplantes autólogos. A implicação dessas alterações no desenvolvimento e patogênese do T1D permanece desconhecida e a realização de ensaios funcionais poderá esclarecer o significado biológico das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waldron-Lynch F, Herold KC. Advances in Type 1 diabetes therapeutics: immunomodulation and beta-cell salvage. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009;38(2):303-17, viii.
2. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 625-40.
3. Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, et al. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol.* 2002;169(1):5-9.
4. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3705-11.
5. Reynier F, Pachot A, Paye M, Xu Q, Turrel-Davin F, Petit F, et al. Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-1 diabetes using whole-blood microarray analysis. *Genes Immun.* 2010;11(3):269-78.
6. Padmos RC, Schloot NC, Beyan H, Ruwhof C, Staal FJ, de Ridder D, et al. Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes. *Diabetes.* 2008;57(10):2768-73.
7. Irvine KM, Gallego P, An X, Best SE, Thomas G, Wells C, et al. Peripheral blood monocyte gene expression profile clinically stratifies patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012;61(5):1281-90.
8. Beyan H, Drexhage RC, van der Heul Nieuwenhuijsen L, de Wit H, Padmos RC, Schloot NC, et al. Monocyte gene-expression profiles associated with childhood-onset type 1 diabetes and disease risk: a study of identical twins. *Diabetes.* 2010;59(7):1751-5.
9. Planas R, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. *Immunol Lett.* 2010;133(2):55-61.
10. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011;91(1):79-118.
11. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature.* 2010;464(7293):1293-300.
12. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia.* 2003;46(3):305-21.
13. Mallone R, van Endert P. T cells in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2008;8(2):101-6.
14. Marleau AM, Summers KL, Singh B. Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2008;180(8):5235-49.
15. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med.* 2003;198(10):1527-37.
16. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5115-20.
17. Brauner H, Elemans M, Lemos S, Broberger C, Holmberg D, Flodström-Tullberg M, et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2010;184(5):2272-80.
18. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008;223:284-99.
19. Novak J, Griseri T, Beaudoin L, Lehuen A. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. *Int Rev Immunol.* 2007;26(1-2):49-72.
20. Driver JP, Scheuplein F, Chen YG, Grier AE, Wilson SB, Serreze DV. Invariant natural killer T-cell control of type 1 diabetes: a dendritic cell genetic decision of a silver bullet or Russian roulette. *Diabetes.* 2010;59(2):423-32.
21. Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest.* 1993;92(5):2313-22.
22. Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med.* 2002;196(3):369-77.
23. Arnush M, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB, Corbett JA. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol.* 1998;160(6):2684-91.

24. Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol.* 1998;160(7):3585-93.
25. Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB, Beller DI. Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes.* 2000;49(7):1106-15.
26. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1999;189(2):347-58.
27. Poligone B, Weaver DJ, Jr., Sen P, Baldwin AS, Jr., Tisch R. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol.* 2002;168(1):188-96.
28. Steptoe RJ, Ritchie JM, Harrison LC. Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2002;168(10):5032-41.
29. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28(4):454-67.
30. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, et al. Innocuous IFNgamma induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med.* 2008;205(1):207-18.
31. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2009;58(6):1302-11.
32. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun.* 25 Suppl. England2005. p. 56-62.
33. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12(4):431-40.
34. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 5. England2009. p. 219-26.
35. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, Hamaguchi Y, Wang Y, Pop SM, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol.* 2008;180(5):2863-75.
36. Brodie GM, Wallberg M, Santamaria P, Wong FS, Green EA. B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes.* 57. United States2008. p. 909-17.
37. Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 92. United States2007. p. 2403-7.
38. Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, 3rd, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 1998;21(1):143-56.
39. Sima AA, Zhang W, Grunberger G. Type 1 diabetic neuropathy and C-peptide. *Exp Diabetes Res.* 5. United States2004. p. 65-77.
40. Ingberg CM, Palmer M, Schvarcz E, Aman J. Prevalence of urinary tract symptoms in long-standing type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 24. France1998. p. 351-4.
41. Stiller CR, Dupré J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science.* 1984;223(4643):1362-7.
42. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;319(10):599-604.
43. Parving HH, Tarnow L, Nielsen FS, Rossing P, Mandrup-Poulsen T, Osterby R, et al. Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care.* 1999;22(3):478-83.
44. Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol.* 1997;158(6):2947-54.
45. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(1):123-7.
46. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Mégret J, Bach JF, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.* 2003;9(9):1202-8.
47. Press release: MacroGenics and Lilly announce pivotal clinical trial of teplizumab did not meet primary efficacy endpoint [Internet]. 2010. Available from: http://www.macrogenics.com/press_releases-284.html.

48. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2143-52.
49. Herold KC, Pescovitz MD, McGee P, Krause-Steinrauf H, Spain LM, Bourcier K, et al. Increased T cell proliferative responses to islet antigens identify clinical responders to anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) therapy in type 1 diabetes. *J Immunol*. 2011;187(4):1998-2005.
50. Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefanski D, Balabanov R, Katsamakis G, et al. Autologous non-myeloablative haematopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol*. 8. England 2009. p. 244-53.
51. Burt RK, Traynor A, Statkute L, Barr WG, Rosa R, Schroeder J, et al. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *JAMA*. 295. United States 2006. p. 527-35.
52. Farge D, Labopin M, Tyndall A, Fassas A, Mancardi GL, Van Laar J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica*. 95. Italy 2010. p. 284-92.
53. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 297. United States 2007. p. 1568-76.
54. Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 301. United States 2009. p. 1573-9.
55. Snarski E, Milczarczyk A, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Król M, et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(4):562-6.
56. Roord ST, de Jager W, Boon L, Wulffraat N, Martens A, Prakken B, et al. Autologous bone marrow transplantation in autoimmune arthritis restores immune homeostasis through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood*. 111. United States 2008. p. 5233-41.
57. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med*. 201. United States 2005. p. 805-16.
58. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 113. United States 2009. p. 214-23.
59. Snarski E, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Milczarczyk A, Jedynasty K, et al. Alleviation of exogenous insulin requirement in type 1 diabetes mellitus after immunoablation and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. *Pol Arch Med Wewn*. 2009;119(6):422-6.
60. Isern J, Méndez-Ferrer S. Stem cell interactions in a bone marrow niche. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9(4):210-8.
61. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):201-9.
62. Oh IH, Humphries RK. Concise review: Multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state. *Stem Cells*. 2012;30(1):82-8.
63. Chotinantakul K, Leeanansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res*. 2012;2012:270425.
64. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 2003;19(2):257-67.
65. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):107-16.
66. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.
67. Larochelle A, Krouse A, Metzger M, Orlic D, Donahue RE, Fricker S, et al. AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates. *Blood*. 2006;107(9):3772-8.

68. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005;201(8):1307-18.
69. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(1):49-60.
70. Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3029-34.
72. Lo Celso C, Scadden DT. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 21):3529-35.
73. Li T, Wu Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:353878.
74. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
75. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.
76. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013.
77. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
78. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:63-76.
79. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
80. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
81. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(7):1759-67.
82. Vieira NM, Bueno CR, Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*. 2008;26(9):2391-8.
83. Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, Dieng MM, Patey N, Despars G, et al. Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev*. 2012;21(10):1616-26.
84. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp NP, et al. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy*. 2008;10(8):784-95.
85. Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp Hematol*. 2008;36(11):1545-55.
86. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006;107(12):4817-24.
87. François M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 2009;114(13):2632-8.
88. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006;107(6):2570-7.
89. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):353-63.
90. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
91. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillier A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27(8):1954-62.
92. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*. 2010;184(5):2321-8.

93. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 2012;33(3):136-43.
94. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett.* 2007;110(2):91-100.
95. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):386-98.
96. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011;25(9):1408-14.
97. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36.
98. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
99. Bassi E, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Câmara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8(2):329-42.
100. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-43.
101. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005;105(10):4120-6.
102. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2006;177(4):2080-7.
103. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation.* 2007;83(1):71-6.
104. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008;26(1):212-22.
105. Bassi EJ, Moraes-Vieira PM, Moreira Sá CS, Almeida DC, Vieira LM, Cunha CS, et al. Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes. *Diabetes.* 2012.
106. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111(3):1327-33.
107. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
108. Meirelles LaS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-27.
109. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17438-43.
110. Zhao W, Wang Y, Wang D, Sun B, Wang G, Wang J, et al. TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol.* 2008;253(1-2):23-30.
111. Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun.* 2009;32(1):33-42.
112. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia.* 2009;52(7):1391-9.
113. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1176:101-17.
114. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 2009;183(2):993-1004.

115. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006;108(6):2114-20.
116. Bernardo ME, Avanzini MA, Ciccocioppo R, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, et al. Phenotypical/functional characterization of in vitro-expanded mesenchymal stromal cells from patients with Crohn's disease. *Cytotherapy*. 2009;11(7):825-36.
117. Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, et al. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(6):741-9.
118. Larghero J, Farge D, Braccini A, Lecourt S, Scherberich A, Foïs E, et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(4):443-9.
119. Vanneaux V, Farge-Bancel D, Lecourt S, Baraut J, Cras A, Jean-Louis F, et al. Expression of transforming growth factor β receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ Open*. 2013;3(1).
120. Oliveira G. Biological and functional analysis of mesenchymal stromal cells from multiple sclerosis patients. In: de Lima K, editor. 2013.
121. Mallam E, Kemp K, Wilkins A, Rice C, Scolding N. Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(8):909-18.
122. Sun LY, Zhang HY, Feng XB, Hou YY, Lu LW, Fan LM. Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(2):121-8.
123. Nie Y, Lau C, Lie A, Chan G, Mok M. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010;19(7):850-9.
124. Ikehara S, Kawamura M, Takao F, Inaba M, Yasumizu R, Than S, et al. Organ-specific and systemic autoimmune diseases originate from defects in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8341-4.
125. Ikehara S, Inaba M, Yasumizu R, Nagata N, Toki J, Hisha H, et al. Autoimmune diseases as stem cell disorders. *Tohoku J Exp Med*. 1994;173(1):141-55.
126. Ikehara S. Autoimmune diseases as stem cell disorders: normal stem cell transplant for their treatment (Review). *Int J Mol Med*. 1998;1(1):5-16.
127. Lutterotti A, Jelčić I, Schulze C, Schippling S, Breiden P, Mazzanti B, et al. No proinflammatory signature in CD34+ hematopoietic progenitor cells in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2012;18(8):1188-92.
128. Kalscheuer H, Danzl N, Onoe T, Faust T, Winchester R, Goland R, et al. A model for personalized in vivo analysis of human immune responsiveness. *Sci Transl Med*. 2012;4(125):125ra30.
129. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1974;4(4):269-74.
130. Silver JD, Ritchie ME, Smyth GK. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*. 2009;10(2):352-63.
131. Wilkerson MD, Hayes DN. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. *Bioinformatics*. 2010;26(12):1572-3.
132. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*. 40. England2012. p. D109-14.
133. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
134. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. *Nat Genet*. 2006;38(5):500-1.
135. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):1-13.
136. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
137. 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):315-7.
138. Klein G, Müller CA, Tillet E, Chu ML, Timpl R. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood*. 1995;86(5):1740-8.

139. Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*. 2006;24(11):2346-54.
140. Semon JA, Nagy LH, Llamas CB, Tucker HA, Lee RH, Prockop DJ. Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *Cell Tissue Res*. 2010;341(1):147-58.
141. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*. 2003;21(5):527-35.
142. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int*. 2007;72(4):430-41.
143. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*. 2011;20(1):53-66.
144. Niehage C, Steenblock C, Pursche T, Bornhäuser M, Corbeil D, Hoflack B. The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e20399.
145. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.
146. Estrada R, Li N, Sarojini H, An J, Lee MJ, Wang E. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol*. 2009;219(3):563-71.
147. Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Faber A, Krause U, et al. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol*. 2007;35(2):314-25.
148. Ferraro F, Lymperi S, Méndez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, et al. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra1.
149. Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):159-67.
150. Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ch'ng E, et al. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*. 2002;419(6907):629-33.
151. Kumanogoh A, Shikina T, Suzuki K, Uematsu S, Yukawa K, Kashiwamura S, et al. Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity*. 2005;22(3):305-16.
152. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
153. Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:213-37.
154. Mayer U, Saher G, Fässler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, et al. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1997;17(3):318-23.
155. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-8.
156. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475(7355):222-5.
157. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24(4):1030-41.
158. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*. 2008;112(13):4991-8.
159. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *J Immunol*. 2009;182(10):5994-6002.
160. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):383-96.
161. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2011;34(4):590-601.
162. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(6):2305-9.
163. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*. 1993;261(5121):600-3.

164. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(10):643-55.
165. Schajnovitz A, Itkin T, D'Uva G, Kalinkovich A, Golan K, Ludin A, et al. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol.* 2011;12(5):391-8.
166. Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):103-14.
167. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(4):290-301.
168. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med.* 2011;208(3):421-8.
169. Rankin SM. Chemokines and adult bone marrow stem cells. *Immunol Lett.* 2012;145(1-2):47-54.
170. White JR, Imburgia C, Dul E, Appelbaum E, O'Donnell K, O'Shannessy DJ, et al. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J Leukoc Biol.* 1997;62(5):667-75.
171. Han W, Lou Y, Tang J, Zhang Y, Chen Y, Li Y, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity. *Biochem J.* 2001;357(Pt 1):127-35.
172. Mei J, Liu Y, Dai N, Favara M, Greene T, Jeyaseelan S, et al. CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity.* 2010;33(1):106-17.
173. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 2007;137(6):491-502.
174. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery.* 2001;49(5):1196-203; discussion 203-4.
175. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106(5):1755-61.
176. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8407-11.
177. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002;62(13):3603-8.
178. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 2004;104(12):3581-7.
179. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells.* 2007;25(1):245-51.
180. Chamberlain G, Smith H, Rainger GE, Middleton J. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear. *PLoS One.* 2011;6(9):e25663.
181. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005;106(2):419-27.
182. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood.* 2004;104(9):2643-5.
183. Von Lüttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, et al. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev.* 2005;14(3):329-36.
184. Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006;108(12):3938-44.
185. Chamberlain G, Wright K, Rot A, Ashton B, Middleton J. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS One.* 2008;3(8):e2934.
186. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007;101(1):135-46.

187. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*. 2007;25(7):1737-45.
188. Guilloton F, Caron G, Ménard C, Pangault C, Amé-Thomas P, Dulong J, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood*. 2012;119(11):2556-67.
189. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008;205(4):777-83.
190. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.
191. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-7.
192. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5287-97.
193. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*. 2007;92(4):440-9.
194. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007;109(9):4055-63.
195. Shirvaikar N, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int*. 2012;2012:685267.
196. Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, Shvitiel S, Tesio M, Kalinkovich A, et al. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *J Clin Invest*. 2009;119(3):492-503.
197. Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol*. 2007;8(10):1123-31.
198. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9):973-81.
199. Stone AL, Kroeger M, Sang QX. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem*. 1999;18(4):447-65.
200. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008;29(5):258-89.
201. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):929-41.
202. Hubmacher D, Apte SS. Genetic and functional linkage between ADAMTS superfamily proteins and fibrillin-1: a novel mechanism influencing microfibril assembly and function. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(19):3137-48.
203. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):981-5.
204. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001;11(11):S37-43.
205. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006;24(5):1254-64.
206. Bhoopathi P, Chetty C, Gogineni VR, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS, et al. MMP-2 mediates mesenchymal stem cell tropism towards medulloblastoma tumors. *Gene Ther*. 2011;18(7):692-701.
207. Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes*. 2009;58(8):1797-806.
208. Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, Ode A, Tuischer J, Matziolis G, et al. Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior. *Stem Cells*. 2007;25(8):1985-94.

209. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(3):475-81.
210. Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R33.
211. Kim YM, Kim J, Heo SC, Shin SH, Do EK, Suh DS, et al. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF- β 1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PLoS One*. 2012;7(7):e40820.
212. Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem*. 1995;270(2):801-5.
213. Al-Raawi D, Abu-El-Zahab H, El-Shinawi M, Mohamed MM. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2011;4(4):265-75.
214. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol*. 2000;191(3):245-56.
215. Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, Shimada T, Yamamoto E, Noguchi M, et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res*. 1999;59(2):467-73.
216. Jo Y, Yeon J, Kim HJ, Lee ST. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system. *Biochem J*. 2000;345 Pt 3:511-9.
217. Lehti K, Lohi J, Valtanen H, Keski-Oja J. Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem J*. 1998;334 (Pt 2):345-53.
218. Lu C, Li XY, Hu Y, Rowe RG, Weiss SJ. MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation. *Blood*. 2010;115(2):221-9.
219. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43503-8.
220. DiPersio JF. Diabetic stem-cell "mobilopathy". *N Engl J Med*. 2011;365(26):2536-8.
221. Peters M, Müller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*. 1998;92(10):3495-504.
222. Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity*. 1994;1(9):725-31.
223. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008;26(1):151-62.
224. Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*. 2002;169(8):4213-21.
225. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25(8):2025-32.
226. Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy*. 2009;11(5):570-83.
227. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14247.
228. Silva WA, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):661-9.
229. Du X, Williams DA. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood*. 1997;89(11):3897-908.
230. Maze R, Moritz T, Williams DA. Increased survival and multilineage hematopoietic protection from delayed and severe myelosuppressive effects of a nitrosourea with recombinant interleukin-11. *Cancer Res*. 1994;54(18):4947-51.

231. Paul SR, Yang YC, Donahue RE, Goldring S, Williams DA. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood*. 1991;77(8):1723-33.
232. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485-91.
233. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9(6):841-8.
234. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene*. 2011;30(8):990-1001.
235. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(5):F1626-35.
236. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
237. Ribeiro CA, Fraga JS, Grãos M, Neves NM, Reis RL, Gimble JM, et al. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(3):18.
238. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
239. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(11):2412-9.
240. Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, Ng GH, Leong D, Hutmacher DW, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1598-608.
241. Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2009;27(1):238-49.
242. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*. 2007;25(12):3234-43.
243. Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5652-7.
244. Liu XJ, Zhang JF, Sun B, Peng HS, Kong QF, Bai SS, et al. Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *Clin Exp Immunol*. 2009;158(1):37-44.
245. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):149-60.
246. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2010;184(10):5885-94.
247. Lu L, Xiao M, Grigsby S, Wang WX, Wu B, Shen RN, et al. Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34(3+) stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cord blood plated with and without serum. *Exp Hematol*. 1993;21(11):1442-6.
248. Batard P, Monier MN, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, et al. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 3):383-90.
249. Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996;88(1):82-8.
250. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003;17(9):1731-7.

251. Yu J, Dolter KE. Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1997;3(3):169-77.
252. Shav-Tal Y, Zipori D. The role of activin a in regulation of hemopoiesis. *Stem Cells*. 2002;20(6):493-500.
253. Shoham T, Parameswaran R, Shav-Tal Y, Barda-Saad M, Zipori D. The mesenchymal stroma negatively regulates B cell lymphopoiesis through the expression of activin A. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:245-60.
254. Djouad F, Jackson WM, Bobick BE, Janjanin S, Song Y, Huang GT, et al. Activin A expression regulates multipotency of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(2):11.
255. Gaddy-Kurten D, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC. Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology*. 2002;143(1):74-83.
256. Abe M, Shintani Y, Eto Y, Harada K, Kosaka M, Matsumoto T. Potent induction of activin A secretion from monocytes and bone marrow stromal fibroblasts by cognate interaction with activated T cells. *J Leukoc Biol*. 2002;72(2):347-52.
257. Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, et al. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp Hematol*. 2008;36(5):587-97.
258. Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*. 2008;135(8):1525-35.
259. Porayette P, Paulson RF. BMP4/Smad5 dependent stress erythropoiesis is required for the expansion of erythroid progenitors during fetal development. *Dev Biol*. 2008;317(1):24-35.
260. Sadlon TJ, Lewis ID, D'Andrea RJ. BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells*. 2004;22(4):457-74.
261. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*. 2003;102(3):906-15.
262. Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine*. 2002;17(1):36-42.
263. Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, et al. GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol*. 1997;25(12):1219-26.
264. Dormady SP, Zhang XM, Basch RS. Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12260-5.
265. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci*. 2012;15(6):862-70.
266. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity*. 2010;43(4):255-63.
267. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):11002-7.
268. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):709-16.
269. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):183-92.
270. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(4):225-35.
271. Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS, et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Allergic Airway Inflammation in Mice. *Stem Cells*. 2012.
272. Fu QL, Chow YY, Sun SJ, Zeng QX, Li HB, Shi JB, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy*. 2012;67(10):1215-22.
273. Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*. 2011;29(7):1137-48.
274. Turner KJ, Neben S, Weich N, Schaub RG, Goldman SJ. The role of recombinant interleukin 11 in megakaryocytopoiesis. *Stem Cells*. 1996;14 Suppl 1:53-61.

275. Du XX, Neben T, Goldman S, Williams DA. Effects of recombinant human interleukin-11 on hematopoietic reconstitution in transplant mice: acceleration of recovery of peripheral blood neutrophils and platelets. *Blood*. 1993;81(1):27-34.
276. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood*. 2003;102(9):3154-62.
277. Minehata K, Takeuchi M, Hirabayashi Y, Inoue T, Donovan PJ, Tanaka M, et al. Oncostatin m maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Int J Hematol*. 2006;84(4):319-27.
278. Lee MJ, Song HY, Kim MR, Sung SM, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M stimulates expression of stromal-derived factor-1 in human mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(3):650-9.
279. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecros J, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*. 2012;30(4):762-72.
280. Song HY, Jeon ES, Kim JI, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2007;101(5):1238-51.
281. Song HY, Jeon ES, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(11):2357-65.
282. Drechsler J, Grötzinger J, Hermanns HM. Characterization of the rat oncostatin m receptor complex which resembles the human, but differs from the murine cytokine receptor. *PLoS One*. 2012;7(8):e43155.
283. Scheller EL, Song J, Dishowitz MI, Soki FN, Hankenson KD, Krebsbach PH. Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*. 2010;28(6):1071-80.
284. Peiffer I, Eid P, Barbet R, Li ML, Oostendorp RA, Haydont V, et al. A sub-population of high proliferative potential-quiescent human mesenchymal stem cells is under the reversible control of interferon alpha/beta. *Leukemia*. 2007;21(4):714-24.
285. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
286. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, et al. Pretreatment with interferon-γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*. 2011;29(10):1549-58.
287. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, et al. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1096-104.
288. Siegert S, Huang HY, Yang CY, Scarpellino L, Carrie L, Essex S, et al. Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One*. 2011;6(11):e27618.
289. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.
290. Luan X, Lu Q, Jiang Y, Zhang S, Wang Q, Yuan H, et al. Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *J Immunol*. 2012;189(1):245-52.
291. Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1658-67.
292. Meylan F, Davidson TS, Kahle E, Kinder M, Acharya K, Jankovic D, et al. The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity*. 2008;29(1):79-89.
293. Migone TS, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, et al. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*. 2002;16(3):479-92.
294. Pobezinskaya YL, Choksi S, Morgan MJ, Cao X, Liu ZG. The adaptor protein TRADD is essential for TNF-like ligand 1A/death receptor 3 signaling. *J Immunol*. 2011;186(9):5212-6.
295. Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, et al. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*. 2005;45(3):353-9.
296. Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, et al. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*. 2005;45(3):345-51.

297. Benschop R, Wei T, Na S. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFR-related death receptor-6, DR6. *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:186-94.
298. Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, Brown SA, et al. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* 2006;25(24):5826-39.
299. Liu C, Ding H, Zhu W, Jiang S, Xu J, Zou GM. LIGHT regulates the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2012.
300. Secchiero P, Melloni E, Corallini F, Beltrami AP, Alviano F, Milani D, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes migration of human bone marrow multipotent stromal cells. *Stem Cells.* 2008;26(11):2955-63.
301. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells.* 2008;26(1):279-89.
302. Lombardo E, DelaRosa O, Mancheño-Corvo P, Menta R, Ramírez C, Büscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(7):1579-89.
303. Opitz CA, Litzenburger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells.* 2009;27(4):909-19.
304. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Roussio-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood.* 2007;109(4):1422-32.
305. Garlanda C, Anders HJ, Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.* 2009;30(9):439-46.
306. Khan MA, Steiner TS, Sham HP, Bergstrom KS, Huang JT, Assi K, et al. The single IgG IL-1-related receptor controls TLR responses in differentiated human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2010;184(5):2305-13.
307. Xiao H, Gulen MF, Qin J, Yao J, Bulek K, Kish D, et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity.* 2007;26(4):461-75.
308. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol.* 2006;177(1):36-9.
309. Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol.* 2010;185(1):302-12.
310. Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol.* 2011;41(10):2840-51.
311. Tataru R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy.* 2011;13(6):686-94.
312. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ.* 2009;16(10):1332-43.
313. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):337-48.
314. Yang L, Chang N, Liu X, Han Z, Zhu T, Li C, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor- β 1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am J Pathol.* 2012;181(1):85-97.
315. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 23):4994-5005.
316. Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, Ffrench M, Martel S, Magaud JP, et al. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp Cell Res.* 2003;282(2):110-20.
317. Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1176:55-69.
318. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY).* 2011;3(10):920-33.

319. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(3):165-97.
320. Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*. 2005;26(1):63-77.
321. Coutu DL, François M, Galipeau J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011;117(25):6801-12.
322. Solchaga LA, Penick K, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(3):1009-19.
323. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
324. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.
325. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):505-16.
326. Wang Y, Weil BR, Herrmann JL, Abarbanell AM, Tan J, Markel TA, et al. MEK, p38, and PI-3K mediate cross talk between EGFR and TNFR in enhancing hepatocyte growth factor production from human mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(5):C1284-93.
327. Wang Y, Wang M, Abarbanell AM, Weil BR, Herrmann JL, Tan J, et al. MEK mediates the novel cross talk between TNFR2 and TGF-EGFR in enhancing vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human mesenchymal stem cells. *Surgery*. 2009;146(2):198-205.
328. De Luca A, Gallo M, Aldinucci D, Ribatti D, Lamura L, D'Alessio A, et al. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(8):2131-8.
329. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(3):686-95.
330. Ding W, Knox TR, Tschumper RC, Wu W, Schwager SM, Boysen JC, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood*. 2010;116(16):2984-93.
331. Ball SG, Shuttleworth A, Kielty CM. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells*. 2012;30(3):548-60.
332. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):1012-30.
333. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(1):57-71.
334. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*. 2008;133(1):38-52.
335. Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, et al. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell*. 2006;124(1):161-73.
336. Arthur A, Zannettino A, Panagopoulos R, Koblar SA, Sims NA, Stylianou C, et al. EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation. *Bone*. 2011;48(3):533-42.
337. Duffy GP, D'Arcy S, Ahsan T, Nerem RM, O'Brien T, Barry F. Mesenchymal stem cells overexpressing ephrin-b2 rapidly adopt an early endothelial phenotype with simultaneous reduction of osteogenic potential. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2755-68.
338. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*. 1998;8(11):437-41.
339. Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal*. 2006;18(8):1108-16.
340. Lund AW, Stegemann JP, Plopper GE. Mesenchymal Stem Cells Sense Three Dimensional Type I Collagen through Discoidin Domain Receptor 1. *Open Stem Cell J*. 2009;1:40-53.
341. Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G, et al. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*. 106. United States 2005. p. 59-66.
342. Lhoumeau AC, Puppo F, Prébet T, Kodjabachian L, Borg JP. PTK7: a cell polarity receptor with multiple facets. *Cell Cycle*. 2011;10(8):1233-6.

343. Greer PL, Greenberg ME. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*. 2008;59(6):846-60.
344. Rosengård-Bärlund M, Bernardi L, Fagerudd J, Mäntysaari M, Af Björkesten CG, Lindholm H, et al. Early autonomic dysfunction in type 1 diabetes: a reversible disorder? *Diabetologia*. 2009;52(6):1164-72.
345. Straznický NE, Eikelis N, Lambert EA, Esler MD. Mediators of sympathetic activation in metabolic syndrome obesity. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10(6):440-7.
346. Kovach NL, Lin N, Yednock T, Harlan JM, Broudy VC. Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85(1):159-67.
347. Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(5):563-8.
348. Briquet-Laugier V, Lavenue-Bombled C, Schmitt A, Leboeuf M, Uzan G, Dubart-Kupperschmitt A, et al. Probing platelet factor 4 alpha-granule targeting. *J Thromb Haemost*. 2004;2(12):2231-40.
349. Lambert MP, Rauova L, Bailey M, Sola-Visner MC, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications. *Blood*. 2007;110(4):1153-60.
350. Lambert MP, Wang Y, Bdeir KH, Nguyen Y, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. *Blood*. 2009;114(11):2290-8.
351. Calaminus SD, Guitart A, Sinclair A, Schachtner H, Watson SP, Holyoake TL, et al. Lineage tracing of pf4-cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PLoS One*. 2012;7(12):e51361.
352. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-85.
353. Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 1998;91(12):4523-30.
354. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*. 2010;115(10):1897-905.
355. Hartigan AJ, Kallal LE, Hogaboam CM. CCR7 impairs hematopoiesis after hematopoietic stem cell transplantation increasing susceptibility to invasive aspergillosis. *Blood*. 2010;116(24):5383-93.
356. Wimmer A, Khaldoyanidi SK, Judex M, Seroby N, Discipio RG, Schraufstatter IU. CCL18/PARC stimulates hematopoiesis in long-term bone marrow cultures indirectly through its effect on monocytes. *Blood*. 2006;108(12):3722-9.
357. Crosby HA, Lalor PF, Ross E, Newsome PN, Adams DH. Adhesion of human haematopoietic (CD34+) stem cells to human liver compartments is integrin and CD44 dependent and modulated by CXCR3 and CXCR4. *J Hepatol*. 2009;51(4):734-49.
358. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109(5):625-37.
359. Yanai N, Obinata M. Oncostatin m regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001;37(10):698-704.
360. Oostendorp RA, Gilfillan S, Parmar A, Schiemann M, Marz S, Niemeyer M, et al. Oncostatin M-mediated regulation of KIT-ligand-induced extracellular signal-regulated kinase signaling maintains hematopoietic repopulating activity of Lin-CD34+CD133+ cord blood cells. *Stem Cells*. 2008;26(8):2164-72.
361. Orelia C, Peeters M, Haak E, van der Horn K, Dzierzak E. Interleukin-1 regulates hematopoietic progenitor and stem cells in the midgestation mouse fetal liver. *Haematologica*. 2009;94(4):462-9.
362. Watari K, Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H, Schrader JW. Expression of interleukin-1 beta gene in candidate human hematopoietic stem cells. *Blood*. 1994;84(1):36-43.
363. Watari K, Mayani H, Lee F, Dragowska W, Lansdorp PM, Schrader JW. Production of interleukin 1beta by human hematopoietic progenitor cells. *J Clin Invest*. 1996;97(7):1666-74.
364. Lazarova P, Wu Q, Kvalheim G, Suo Z, Haakenstad KW, Metodiev K, et al. Growth factor receptors in hematopoietic stem cells: EPH family expression in CD34+ and CD133+ cell populations from mobilized peripheral blood. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006;19(1):49-56.

365. Ariyama Y, Misawa S, Sonoda Y. Synergistic effects of stem cell factor and interleukin 6 or interleukin 11 on the expansion of murine hematopoietic progenitors in liquid suspension culture. *Stem Cells*. 1995;13(4):404-13.
366. Lazzari L, Lucchi S, Rebulla P, Porretti L, Puglisi G, Lecchi L, et al. Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, Flt3-ligand, interleukin (IL)-6 and IL-11 in a serum-free and stroma-free culture system. *Br J Haematol*. 2001;112(2):397-404.
367. Nitsche A, Junghahn I, Thulke S, Aumann J, Radonić A, Fichtner I, et al. Interleukin-3 promotes proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells but reduces their repopulation potential in NOD/SCID mice. *Stem Cells*. 2003;21(2):236-44.
368. Robin C, Ottersbach K, Durand C, Peeters M, Vanes L, Tybulewicz V, et al. An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell*. 2006;11(2):171-80.
369. Migliaccio G, Migliaccio AR, Visser JW. Synergism between erythropoietin and interleukin-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. *Blood*. 1988;72(3):944-51.
370. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-97.
371. Kaushansky K. Mpl and the hematopoietic stem cell. *Leukemia*. 2002;16(4):738-9.
372. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1195-200.
373. Abkowitz JL, Chen J. Studies of c-Mpl function distinguish the replication of hematopoietic stem cells from the expansion of differentiating clones. *Blood*. 2007;109(12):5186-90.
374. Nishino T, Miyaji K, Ishiwata N, Arai K, Yui M, Asai Y, et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. *Exp Hematol*. 2009;37(11):1364-77.e4.
375. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):671-84.
376. Emerson SG. Thrombopoietin, HSCs, and the osteoblast niche: holding on loosely, but not letting GO. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):599-600.
377. Jacobsen SE, Okkenhaug C, Veiby OP, Caput D, Ferrara P, Minty A. Interleukin 13: novel role in direct regulation of proliferation and differentiation of primitive hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1994;180(1):75-82.
378. Sugawara T, Katayama N, Nishii K, Mahmud N, Mitani H, Ohishi K, et al. Distinctive actions of interleukin-13 and interleukin-4 on growth of hematopoietic progenitors. *Int J Oncol*. 1999;14(3):471-7.
379. Rosenzweig M, Camus S, Guigon M, Gluckman JC. The influence of interleukin (IL)-4, IL-13, and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34+ progenitor cells. *Exp Hematol*. 1998;26(1):63-72.
380. Punia N, Smith S, Thomson JV, Irshad A, Nair P, Sehmi R. Interleukin-4 and interleukin-13 prime migrational responses of haemopoietic progenitor cells to stromal cell-derived factor-1 α . *Clin Exp Allergy*. 2012;42(2):255-64.
381. King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):685-92.
382. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA, et al. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*. 2009;458(7240):904-8.
383. Caux C, Moreau I, Saeland S, Banchereau J. Interferon-gamma enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992;79(10):2628-35.
384. Zhao X, Ren G, Liang L, Ai PZ, Zheng B, Tischfield JA, et al. Brief report: interferon-gamma induces expansion of Lin(-)Sca-1(+)C-Kit(+) Cells. *Stem Cells*. 2010;28(1):122-6.
385. Baldridge MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature*. 2010;465(7299):793-7.
386. Kang YJ, Yang SJ, Park G, Cho B, Min CK, Kim TY, et al. A novel function of interleukin-10 promoting self-renewal of hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(7):1814-22.
387. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev*. 2011;244(1):99-114.
388. Pronk CJ, Veiby OP, Bryder D, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med*. 2011;208(8):1563-70.
389. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(4):1502-6.

390. Ikuta K, Ingolia DE, Friedman J, Heimfeld S, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem cells and the interaction of c-kit receptor and steel factor. *Int J Cell Cloning*. 1991;9(5):451-60.
391. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 1997;90(4):1345-64.
392. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-62.
393. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-42.
394. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, et al. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol*. 2008;180(11):7358-67.
395. Chu SH, Heiser D, Li L, Kaplan I, Collector M, Huso D, et al. FLT3-ITD knockin impairs hematopoietic stem cell quiescence/homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(3):346-58.
396. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 2000;95(11):3489-97.
397. Zhao M, Ross JT, Itkin T, Perry JM, Venkatraman A, Haug JS, et al. FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood*. 2012;120(9):1831-42.
398. Itkin T, Ludin A, Gradus B, Gur-Cohen S, Kalinkovich A, Schajnovitz A, et al. FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. *Blood*. 2012;120(9):1843-55.
399. Krstic A, Mojsilovic S, Jovcic G, Bugarski D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):34-41.
400. von Vietinghoff S, Ley K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol*. 2009;183(2):865-73.
401. Fietze S, Wang R, Yao L, Tak YG, Ye Z, Gaddis M, et al. Cell type-specific binding patterns reveal that TCF7L2 can be tethered to the genome by association with GATA3. *Genome Biol*. 2012;13(9):R52.
402. Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci*. 2008;99(4):631-7.
403. Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, et al. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):345-56.
404. Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, et al. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*. 2012;150(2):351-65.
405. Trompouki E, Bowman TV, Lawton LN, Fan ZP, Wu DC, DiBiase A, et al. Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration. *Cell*. 2011;147(3):577-89.
406. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, et al. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*. 2007;50(1):63-7.
407. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006;38(3):320-3.
408. Palmer ND, Hester JM, An SS, Adeyemo A, Rotimi C, Langeveld CD, et al. Resequencing and analysis of variation in the TCF7L2 gene in African Americans suggests that SNP rs7903146 is the causal diabetes susceptibility variant. *Diabetes*. 2011;60(2):662-8.
409. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HE, et al. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes*. 2007;56(2):389-93.
410. Oh KJ, Park J, Kim SS, Oh H, Choi CS, Koo SH. TCF7L2 modulates glucose homeostasis by regulating CREB- and FoxO1-dependent transcriptional pathway in the liver. *PLoS Genet*. 2012;8(9):e1002986.
411. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):275-83.
412. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, Di Giandomenico S, et al. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):37-48.
413. van Os R, de Haan G, Dykstra BJ. Hematopoietic stem cell quiescence: yet another role for p53. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):7-8.
414. Asai T, Liu Y, Di Giandomenico S, Bae N, Ndiaye-Lobry D, Deblasio A, et al. Necdin, a p53 target gene, regulates the quiescence and response to genotoxic stress of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2012;120(8):1601-12.

415. Dumble M, Moore L, Chambers SM, Geiger H, Van Zant G, Goodell MA, et al. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*. 2007;109(4):1736-42.
416. Nii T, Marumoto T, Tani K. Roles of p53 in various biological aspects of hematopoietic stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:903435.

APÊNDICES E ANEXOS

7. APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A. Géis representativos das amostras de RNA.

Figura A1. Géis dos RNAs extraídos de MSCs/HSCs de pacientes com T1D e controles.

a) Amostras dos RNAs extraídos de MSCs de pacientes com T1D pré-AHSCT, pós-AHSCT e controles, na 3ª passagem. Linhas 1-4 (RNAs extraídos de amostras de MSCs pré-AHSCT). Linhas 5-8 (amostras de MSCs pós-AHSCT) e linhas 9-12 (amostras das MSCs controles). b) Amostras dos RNAs extraídos de HSCs de pacientes com T1D e controles. Linhas 1-4 (RNAs extraídos de amostras de HSCs pré-AHSCT). Linhas 5-11 (amostras de HSCs controles).

Apêndice B. Controle de qualidade dos arrays das HSCs.

Figura B1. MA plots dos 4 arrays (HSCs) com maior (acima) e menor (abaixo) valor de D.

O valor de D encontra-se na parte superior de cada MA plot. Array 2 = DM13; Array 5 = DM01 D180; Array 6 = Array 1 = NM42; Array 2 = NM40; Array 3 = NM43 = NM44; Array 5 = DM2; Array 6 = DM5; Array 7 = DM6; Array 8 = DM17.

Figura B2. Representação em forma de heatmap das distâncias entre os *arrays*.

Os valores estão representados de 0.0 a 1.0 (escala do azul ao amarelo), no qual 0.0 indica identidade completa. Array 1 = NM42; Array 2 = NM40; Array 3 = NM43 = NM44; Array 5 = DM2; Array 6 = DM5; Array 7 = DM6; Array 8 = DM17. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos.

Figura B3. Distribuição das amostras (HSCs) quanto à intensidade dos sinais. Cada boxplot representa uma amostra.

Os boxplots apresentam-se na mesma posição e possuem a mesma largura, o que indica normalização ideal. Array 1 = NM42; Array 2 = NM40; Array 3 = NM43 = NM44; Array 5 = DM2; Array 6 = DM5; Array 7 = DM6; Array 8 = DM17. CTRL = controles; D-PRE = diabéticos.

Figura B4. Estimativa das densidades de intensidade das amostras (HSCs).

Os dados apresentaram formas e valores similares, o que indica uma normalização ideal. CTL = controles; D-PRE = diabéticos.

Anexo A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – Projeto Universal.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC 50 anos
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 06 de julho de 2006

Ofício nº 1885/2006
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 10095/2002

Prezado Professor:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 228ª Reunião Ordinária realizada em 03/07/2006, **analisou e aprovou** a solicitação de Vossa Senhoria para a ampliação do número de sujeitos a serem incluídos no estudo intitulado **“TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS DO TIPO 1”**. O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.

Aproveito a oportunidade para renovar protestos de estima e consideração.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. JÚLIO CÉSAR VOLTARELLI
Depto. de Clínica Médica
Em mãos

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP
(016)3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br