



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em coelhos - *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para defesa da tese para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2023

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em
coelhos - *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
defesa da tese para obtenção do título de
Doutora em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Rodrigues, Lenize da Silva.

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos : modelo em coelhos - *in vitro* / Lenize da Silva Rodrigues. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Matheus Bertanha

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 40102041

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Doença Arterial Periférica. 3. Células-Tronco. 4. Endotélio. 5. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimal; Doença Arterial Periférica; Neovasos; Scaffolds; Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecido.

Impacto da Pesquisa

Esta pesquisa experimental em modelo animal em coelhos teve o objetivo de desenvolver um modelo de neovaso sanguíneo, *in vitro*, para futura aplicação como substituto vascular em revascularizações arteriais. Para isso, foram empregadas veias descelularizadas como arcabouços e técnicas de Engenharia de Tecidos com células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo para a regeneração dos componentes celulares do vaso sanguíneo, endotélio e músculo liso, com estímulo de fatores de crescimento e diferenciação celular. Este modelo experimental faz parte de uma linha de pesquisa que pretende levar a terapia substitutiva baseada em medicina personalizada para futura aplicação médica em humanos, fornecendo vasos sanguíneos para doentes que se encontram sem fontes de vasos autólogos para a confecção de pontes ou *bypass* cardiovasculares. A endotelização e a reestruturação da camada muscular em uma estrutura tridimensional deve trazer vantagens significativas para os portadores de doenças cardiovasculares, como maior patência das pontes vasculares pelo efeito antitrombótico do endotélio e maior resistência a infecções em comparação com tecidos sintéticos.

Ainda, todo o processo de desenvolvimento tecnológico gerou aumento da capacitação intelectual da equipe envolvida, consolidação de técnicas de engenharia celular, ampliação do perfil multiprofissional dos envolvidos, evolução institucional e profissional em uma área considerada a fronteira do conhecimento científico atual. Por fim, permitirá a produção de artigos científicos com publicações de maior impacto e excelência nacional, trazendo maior visibilidade para a instituição sede em nível nacional e internacional.

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em coelhos - *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Comissão Examinadora da Defesa - Titulares

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Profa. Dra. Ana Terezinha Guillaumon
Universidade de Campinas - UNICAMP

Dra. Helga Caputo Nunes Holzhausen
Centro de Ensino e Pesquisa Hospital Israelita Albert Einstein

Comissão Examinadora da Defesa - Suplentes

Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Dr. Nilton José dos Santos
Universidade de Campinas – UNICAMP

Profa Dra. Hilde Buzzá
Facultad de Física Pontificia Universidad Católica de Chile University of Victoria

Botucatu, 28 de Julho de 2023.

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Maria Aparecida e Avelino, por todo apoio emocional e força. Pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis. Serão eternamente meus exemplos de vida.

À minha querida irmã, Laís, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis. E pelos seus divertidos “aonde nós vamos dessa vez? ”.

Ao meu querido avô padrinho, Olívio Augusto (in memorian), por sempre me dar o apoio, me incentivar a buscar meus sonhos e objetivos. Sempre será meu herói, meu orgulho e meu exemplo.

Agradecimentos

“À Deus,

Pois Deus não nos deu um espírito de timidez, mas de fortaleza, de amor e de sabedoria. ” (2 Timóteo 1, 7)

Aos meus pais, Maria Aparecida e Avelino, por sempre zelarem pela minha formação e pela minha vida em todos os momentos.

À minha querida irmã, Laís, e ao meu cunhado Takao por todo apoio quando mais precisei.

A todos os meus amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado, tornando mais fácil os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Professor Dr^o Matheus Bertanha, pelos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho, pela orientação excepcional, e sem dúvida, por todo estímulo e apoio dado para realização deste trabalho. Sei que não só ganhei um mestre, mas ganhei também um amigo.

À professora Dra. Elenice Deffune, que, sempre esteve quando precisei de orientações específicas.

À equipe do LBA por toda ajuda. A equipe da UNIPLEX -FMB por todo carinho e ajuda nos experimentos. A toda a equipe da Neogene-UNIPLEX-FMB por toda paciência, ensinamentos e ajuda em algumas etapas da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Ortopedia por todo incentivo e apoio. Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia: Douglas de Jesus, Marinede Jorge, Simone Camargo pelo apoio.

À Pós-graduação representada pela Professora Dra. Patrícia Pintor Reis, que permitiu meu ingresso no doutorado e me apoiou nas mudanças necessárias.

À secretária da pós-graduação, Marcia, por toda paciência e carinho nesses anos. E a todos os professores da pós-graduação de Cirurgia e Medicina Translacional pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos Karise Naves, Mariana Secondo, Nathália Sertório, Vinicius Tadeu, Pedro Melluci e Rita de Cássia Alvarado que ao longo desses anos, sofremos, rimos e vencemos nesta caminhada.

À minha querida amiga Marluci, por todo apoio e carinho nesses anos todos, e a toda equipe da biblioteca da FMB.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, representada hoje pelo Magnífico Reitor Professor Titular Pasqual Barretti, pelo fornecimento da infraestrutura que tem sido fundamental para o desenvolvimento da minha carreira como pesquisadora;

À Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, representada hoje pelo Excelentíssimo Diretor Professor Titular Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, pelo fornecimento da infraestrutura que tem sido fundamental para o desenvolvimento da minha carreira como professor e pesquisador;

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

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar as pesquisas do meu orientador e contribuir com o avanço da ciência brasileira

Às pessoas não citadas explicitamente, cujo apoio jamais me faltaram, o meu sincero pedido de desculpas, e a certeza de que a omissão ser restrita apenas a estas páginas, meu muito obrigada!

Epígrafe

*[...] só a caminhada consegue nos libertar das
ilusões do indispensável.*

Frédéric Gros

Resumo

Resumo

Introdução: As doenças cardiovasculares são as principais responsáveis pela mortalidade da população ocidental, sendo que a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) representa 5% desse contingente. Pacientes sintomáticos possuem rápida evolução do quadro clínico quando tratados inadequadamente, sendo que cerca de 25% passam por amputação do membro inferior acometido. Com isso, pesquisas recentes vêm mostrando um futuro promissor na terapia regenerativa e substitutiva de tecidos envolvendo células-tronco mesenquimais (CTM) e engenharia celular, incluindo a engenharia de tecidos em vasos sanguíneos (tissue-engineered blood vessels – TEBV). **Objetivo:** Aprimorar as técnicas de TEBV a partir de modelo animal (coelhos), *in vitro*, a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASC) em endotélio e músculo liso. **Métodos:** Veias cavas inferiores (VCI) foram obtidas de 30 coelhos fêmeas, não prenhas, para proceder a descclularização e servirem de *scaffold*. Cada VCI foi fragmentada em segmentos de 2cm e a descclularização foi realizada por meio de protocolos estabelecidos com Dodecil sulfato de sódio 1% (SDS) por 2h. Para obtenção das ASCs, tecido adiposo (TA) interescapular foi obtido dos mesmos animais doadores das veias cavas inferiores. Após a dissociação enzimática do TA e a expansão da cultura das ASCs em número necessário, estas foram aplicadas na luz dos *scaffolds* 3D com Puramatrix®, sendo mantidos em placas de cultura de 24 poços, individualmente. Para indução da diferenciação endotelial das células aderidas ao arcabouço, o meio de cultura DMEM foi suplementado com VEGF (50ng/mL), FGF (20ng/mL), IGF (20ng/mL) e GF (20ng/mL), e mantidas por 2, 4 e 8 semanas em cultura. Por análise histopatológica determinou-se o melhor protocolo. A seguir, fez-se a acreção de músculo liso pré-diferenciado por 4 semanas (DMEM+ BMP4 2,5ng/mL e TGF-1 5ng/mL) também com uso de Puramatrix®. Observou-se os resultados histológicos em 2 e 4 semanas e escolheu-se o melhor protocolo. A partir desse resultado, fez-se a quantificação de citocinas no meio de cultura e quantificação da expressão de miRNAs nos neovasos (em triplicata). **Resultados:** No experimento de endotelização do *scaffold*, obtivemos uma melhor distribuição celular tempo-benefício para o tempo de 4 semanas. Em sequência, na adesão de músculo liso, observou-se melhores resultados também em 4 semanas de co-cultura. Análises por HE, imunohistoquímica e imunofluorescência comprovaram a diferenciação celular endotelial e músculo liso. Técnica de miRNAs puderam revelar algumas das vias genéticas envolvidas na TEBV, principalmente no que tange a imaturidade celular. **Conclusão:** O modelo biológico de *scaffold* de veia cava inferior descclularizado e recelularizado, *in vitro*, demonstrou boa celularização e diferenciação celular. As técnicas histológicas, análises de citocinas e do perfil global de expressão de miRNAs sugerem que os resultados são promissores para futuro uso da TEBV em modelo *in vivo*.

Abstract

Abstract

Background: Background: Cardiovascular diseases are the main cause of mortality in the Western population, with peripheral arterial disease (PAD) accounting for 5% of this population. Symptomatic patients have a rapid evolution of the clinical condition when inadequately treated, and about 25% undergo amputation of the affected lower limb. As a result, recent research has shown a promising future in regenerative and tissue replacement therapy involving mesenchymal stem cells (MSC) and cell engineering, including tissue-engineered blood vessels (TEBV) engineering. **Objective:** To improve TEBV techniques from an animal model (rabbits), in vitro, from the differentiation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ASC) into endothelium and smooth muscle. **Methods:** Inferior vena cava (IVC) were obtained from 30 female rabbits, not pregnant, to proceed with decellularization and serve as a scaffold. Each IVC was fragmented into 2cm segments and decellularization was performed using established protocols with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 2h. To obtain the ASCs, interscapular adipose tissue (AT) was obtained from the same donor animals of the inferior vena cava. After the enzymatic dissociation of the TA and the expansion of the culture of the ASCs in the necessary number, these were applied in the light of the 3D scaffolds with Puramatrix®, being maintained in culture plates of 24 wells, individually. To induce endothelial differentiation of cells adhered to the scaffold, the DMEM culture medium was supplemented with VEGF (50ng/mL), FGF (20ng/mL), IGF (20ng/mL), and GF (20ng/mL), and maintained for 2, 4 and 8 weeks in culture. By histopathological analysis, the best protocol was determined. Next, pre-differentiated smooth muscle accretion was performed for 4 weeks (DMEM+ BMP4 2.5ng/mL and TGF-1 5ng/mL) also using Puramatrix®. Histological results were observed at 2 and 4 weeks and the best protocol was chosen. Based on this result, the quantification of cytokines in the culture medium and the quantification of the expression of miRNAs in the neovessels (in triplicate). **Results:** In the scaffold endothelialization experiment, we obtained a better time-benefit cellular distribution for the 4-week period. In sequence, in smooth muscle adhesion, better results were also observed in 4 weeks of co-culture. Analysis by HE, immunohistochemistry, and immunofluorescence confirmed endothelial and smooth muscle cell differentiation. miRNAs technique could reveal some of the genetic pathways involved in TEBV, mainly with regard to cellular immaturity. **Conclusion:** The biological model of decellularized and recellularized inferior vena cava scaffold, in vitro, demonstrated good cellularization and cell differentiation. Histological techniques, cytokine analysis, and global miRNA expression profile suggest that the results are promising for future use of TEBV in an in vivo model.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema da estrutura de grandes vasos sanguíneos. _____ 32
- Figura 2.** Fotomicrografia do corte histológico com coloração em HE do controle dos *scaffolds*. _____ 64
- Figura 3.** Fotomicrografia de cultura de ASC por microscopia invertida, contraste de fase em **A:** 3 dias; **B:** 15 dias. 40x. _____ 66
- Figura 4.** Fotomicrografia por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em tecido adiposo. _____ 67
- Figura 5.** Fotomicrográficas por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em Células ósseas. _____ 67
- Figura 6.** Fotomicrografia por microscopia da diferenciação condrogênica de ASC corada com Azul de Toluidina. _____ 68
- Figura 7.** Perfil fenotípico das ASC, com marcadores CD90/45, CD106/11B e CD 71/31 pela técnica de citometria de fluxo. _____ 69
- Figura 8.** Fotomicrografia das lâminas de Imunofluorescência, com marcação de Dapi. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. _____ 70
- Figura 9.** Fotomicrografia das lâminas em HE. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. _____ 70
- Figura 10.** Fotomicrografia das lâminas dos *scaffolds* descelularizados com SDS e recelularizado com 1×10^6 celularizado. _____ 71
- Figura 11.** Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 1. **Grupo Controle:** **A** - nas setas indicam a repovoação celular da luz do *scaffold*, **C** e **E** – fotomicrografias de IHQ negativas para marcação de CD31 e CD146, respectivamente; **Grupo Experimento:** **B** - nas setas indicam a repovoação celular linear da luz do *scaffold*, **D** e **F**- fotomicrografias de IHQ positiva para marcação de CD31 e CD146, respectivamente. _____ 72
- Figura 12.** Painel das fotomicrográficas em imunofluorescência do experimento 1, com marcação de CD146 para o endotélio (FITC) e DAPI para os núcleos celulares. **Grupo Controle:** **A:** 2 semanas **C:** 4 semanas e **E:** 8 semanas; **Grupo Experimento:** **B:** 2 semanas, **D:** 4 semanas e **F:** 8 semanas. _____ 73
- Figura 13.** Imagem realizada em microscópio confocal de fluorescência de lâmina
-

de endotelização em tempo de cultura de 4 semanas. _____74

Figura 14. Célula endotelial, originada a partir de recelularização de *scaffold* (descelularizado com SDS) em cultura por 4 semanas. Imagem obtida em microscópio confocal de fluorescência (DAPI = azul = núcleos celulares; FITC = verde = parede celular anti-CD31; marcação com Qtracker = vermelho/alaranjado = marcação citoplasmática de rastreo das ASC cultivadas). _____75

Figura 15. Caracterização da cultura de células musculares lisas. _____76

Figura 16. Fotomicrografia das lâminas do o experimento 3 _____77

Figura 17. Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 1. _____78

Figura 18. Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 2 em imunofluorescência com marcação de com DAPI para os núcleos celulares. ____79

Figura 19. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia Confocal. _____80

Figura 20. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia confocal de fluorescência, evidenciando apenas os núcleos celulares das células na parede externa do *scaffold* (DAPI = azul) e apenas uma célula endotelial na face luminal à esquerda marcada de verde (FITC = CD146). Aumento de 400x + zoom. _____81

Figura 21. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado *versus* controle. _86

Figura 22. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso *versus* controle. _____90

Figura 23. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso *versus* controle. _____91

Figura 24. Rede de vias moleculares das células endotelizadas *versus* CTM indiferenciadas. _____95

Figura 25. Rede de vias moleculares das células musculares lisas *versus* CTM indiferenciadas. _____98

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. MiRNAs pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. _____	48
Tabela 2. Contagem e Viabilidade celular das amostras 1 a 20 de cultura de Células Tronco Mesenquimais. _____	65
Tabela 3. Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante. _____	82
Tabela 4. Experimento 1: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio versus controle). _____	83
Tabela 5. Experimento 2: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio versus controle). _____	87
Tabela 6. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos Scaffold endotelizado versus controle (ASC indiferenciadas). _____	92
Tabela 7. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos Scaffold completo versus controle (ASC indiferenciadas). _____	96

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

Anti-anti	Antibiótico-antifúngico
ASC	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
CE	Célula endotelial
CML	Célula muscular lisa
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
Desc	Descelularizada
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
EDCFs	Fatores de contração
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRFs	Fatores de relaxamento
EGF	Fator de crescimento epitelial
ELAMs	<i>Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule -</i>
ET	Engenharia tecidual ou Engenharia de tecidos

ET-1	Endotelina-1
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FvW	Fator de von Willebrand
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HE	Hematoxilina e eosina
ICM	Isquemia crítica de membros
IF	Imunofluorescência
IGF	Fator de Crescimento Insulínico
IHQ	Imunohistoquímica
incubadora de CO₂ - 5%)	Incubadora com jaqueta de água a 5% de dióxido de carbono
LETC-UNIPEX	Laboratório de Engenharia Tecidual e Celular da Unidade de Pesquisa Experimental
MECdesc	Matrix extracelular descelularizada
MEC	Matrix extracelular
MI	Membros inferiores
miRNAs	MicroRNAs
mmHg	Milímetros de mercúrio
mg/kg	Miligramas por kilo
ml	Mililitros
Músculo liso	ML

M199	Medium 199
N	Número de amostra
NV	Neovaso
NV-CE	Neovaso com ASC diferenciadas em CE
NV-CE/CML	Neovaso com ASC diferenciada em CE e CML (NV-CE/CML)
NO	Óxido nítrico
PGA	Ácido poliglicólico
PDGF-β	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGI₂	Prostaciclina
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PLA	Ácido polilático
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
PVP-I	Polivinilpirrolidona-iodo
RNAs	Ribonucleotídeos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF	Soro fisiológico estéril
SFB	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TEBV	Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos (<i>tissue engineering into blood vessels</i>)
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TGF-1	Fator de crescimento transformante beta tipo 1

3D	Tridimensional
TX-A2	Tromboxano A2
UI	Unidades Internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
UTR	<i>Untranslated region</i>
VCi	Veias cavas inferiores
VCIdesc	Veias cavas inferiores descelularizada
VD	Scaffold de veia descelularizada
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VSMCs	Célula de musculo liso vascular

Sumário

Sumário

Resumo	14
Abstract.....	16
Lista de Figuras	18
Lista de Tabelas	21
Lista de Abreviaturas.....	23
REVISÃO DE LITERATURA	30
1. Circulação periférica	30
1.1 Fisiologia dos grandes vasos sanguíneos	30
1.2 Doença arterial periférica	32
1.3 Revascularização cirúrgica por enxerto ou bypass.....	33
1.4 Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos	34
INTRODUÇÃO.....	39
1. Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos	39
1.1 Descelularização da veia	39
1.2 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo	41
1.3 Endotélio.....	42
1.4 Músculo liso vascular	43
1.5 microRNAs.....	45
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Geral	50
3.2 Específicos.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Local do estudo.....	51
4.2 Procedimentos éticos	51
4.3 Animais e condições de alojamento	51
4.4 Grupos	51
4.5 Eutanásia, manipulação e procedimentos	52
4.5.1 Eutanásia.....	52
4.5.2 Obtenção de veias cavas de coelhos	53
A. Descelularização das VCI.....	53
B. Caracterização Histológica dos scaffolds	54

4.5.3 Obtenção do tecido adiposo.....	54
A. <i>Expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo autóloga</i>	54
B. <i>Contagem e viabilidade celular</i>	56
4.6. Experimentos de diferenciação celular.....	56
4.6.1 Semeadura de ASC.....	56
A. <i>Lúmen do scaffold</i>	56
4.7. Adesão celular ao scaffold 3D.....	57
4.8 Endotelização do scaffold de veia cava inferior	58
4.9 Diferenciação celular em músculo liso.....	58
4.10 Semeadura do músculo liso no scaffold endotelizado.....	59
4.11 Determinação do perfil de interleucinas no sobrenadante.....	59
4.12 Análise do perfil global de expressão de miRNA	60
4.13 Cálculo Amostral e Estatística.....	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1 Obtenção e descelularização de veias cava inferiores	64
5.1.1 Caracterização Histológica em hematoxilina e eosina (HE) dos scaffolds ..	64
5.2 Obtenção de tecido adiposo.....	64
5.2.1 Expansão e viabilidade celular	65
5.2.2 Teste de controle de qualidade das ASC	66
5.3 Experimentos de diferenciação celular.....	69
5.3.1 Adesão celular ao scaffold 3D.....	69
5.3.2 Endotelização do scaffold de veia cava inferior.....	70
5.3.3 Diferenciação celular em musculo liso.....	75
5.3.4 Semeadura do musculo liso no scaffold endotelizado.....	76
5.4 Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante.....	81
5.5 Análise da expressão de miRNAs	82
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÃO.....	99
8. Referências	100
ANEXOS.....	112
Tabelas suplementares.....	115
Atividades científicas	176

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Circulação periférica

1.1 Fisiologia dos grandes vasos sanguíneos

O sistema circulatório ou sistema cardiovascular é representado pelo conjunto formado pelo coração e vasos sanguíneos. Esse sistema é responsável pelo transporte das células sanguíneas e demais componentes do sangue para todas as partes do corpo. Dessa forma, a circulação sanguínea tem como principal função o transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e eliminação dos produtos do metabolismo e do gás carbônico, bem como, manter o equilíbrio do organismo (homeostase), para que as células e sistemas possam desempenhar sua funcionalidade. De modo geral, a grande circulação é composta por vasos sanguíneos, denominados artérias quando saem do coração e veias quando drenam ao coração.¹ As artérias promovem o transporte sanguíneo diante à alta pressão (Figura 1A),¹ por outro lado, as veias transportam o sangue em uma pressão mais baixa. Portanto, as artérias apresentam uma parede com camada muscular suficientemente forte para resistir e controlar a pressões sanguíneas e as veias apresentam uma parede mais fina e elástica, capaz de se contrair e expandir, de acordo com as necessidades fisiológicas de contenção dos volumes sanguíneos como resposta aos estímulos gerados pelo ambiente e também internos do organismo (Figura 1B).¹

Cerca de 16% do volume sanguíneo total se encontra no coração e 84% na circulação sistêmica, destes 64% são veias, 13% são artérias e 7% arteríolas e capilares.¹ Desta forma, a pressão gerada pelo fluxo sanguíneo na entrada das artérias é de 100mmHg e, à medida que o sangue flui para vasos de menor calibre, a pressão média cai, chegando a valores inferiores a 10mmHg, nos capilares sanguíneos das extremidades do corpo.¹

Para que se mantenha um bom funcionamento da circulação sanguínea, ou seja, uma suficiência de perfusão aos tecidos, é necessário um equilíbrio preciso no

funcionamento do *tônus* vascular.²⁻⁴ O funcionamento do *tônus* da musculatura vascular é regulado pelo endotélio vascular através da produção de mediadores que podem produzir vasodilatação: óxido nítrico (NO); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); e a prostaciclina, ou vasoconstrição: prostaglandina H₂, (PGH₂), tromboxana A₂; angiotensina II (Ang II); endotelina-1 (ET-1); e os ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio (ROS).³⁻⁷

Entretanto, em algumas situações fisiopatológicas, como na hipertensão arterial sistêmica (HAS), ocorre a disfunção na liberação dos fatores mediadores do *tônus* vascular, levando ao aumento dos fatores de vasoconstrição e diminuindo os fatores de vasodilatação, determinando, com o passar do tempo, disfunção endotelial.^{4,5,8} A disfunção do *tônus* muscular em associação com a disfunção endotelial pode levar a outras alterações do sistema vascular, como o surgimento de uma hipertrofia miointimal, aumento de rigidez arterial e um *feedback* de remodelação do músculo liso com diminuição do lúmen arterial.^{4,5,8}

O remodelamento vascular induz a proliferação e migração direcionada de células vasculares/endoteliais combinada com a capacidade do sistema vascular em se adaptar de acordo com as condições do organismo, sendo que estes são os principais fatores no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a arteriosclerose, reestenose após angioplastia transluminal e hipertensão arterial.^{4,5,8}

A arteriosclerose apresenta três variações: aterosclerose, que se origina da formação de ateromas (lipídios, carboidratos, componentes do sangue, cálcio e tecido fibroso) nas grandes e médias artérias; esclerose calcificante da média (esclerose de Mönckberg), que decorre da fibrose seguida da calcificação da camada média nas artérias de maior calibre e predispõe a ocorrência de aneurismas; e a arteriolosclerose, que é a variante morfológica que decorre da proliferação fibromuscular ou endotelial em artérias de pequeno calibre ou arteríolas.

Em relação a aterosclerose, sabe-se que o processo advém do acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial, levando a um processo inflamatório reacional e uma série de disfunções endoteliais, promovendo a fagocitose do LDL oxidado por macrófagos que se transformam em células espumosas e acúmulo de detritos do

processo inflamatório subendoteliais. Tais complexos de células espumosas progridem e evoluem com a possibilidade de formação de placas vulneráveis, passíveis de eventos tromboembólicos, o que pode se traduzir em eventos cardiovasculares agudos ou progressivos, sendo este último a causa mais provável da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP).⁹

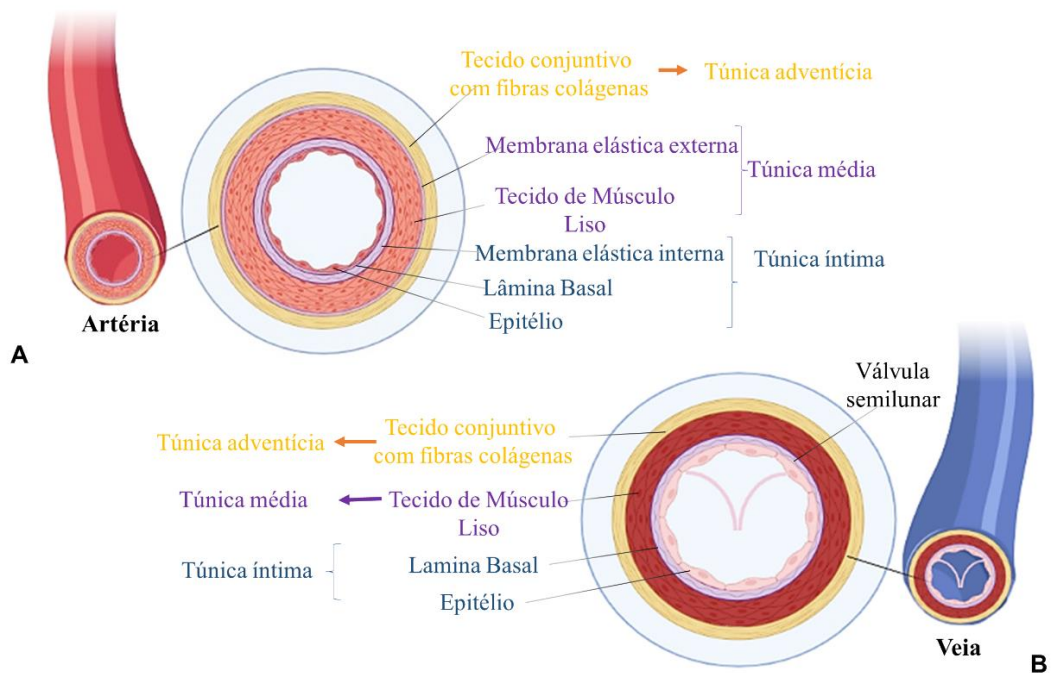


Figura 1. Esquema da estrutura de grandes vasos sanguíneos. **A:** Artéria; **B:** Veia. **Autoria própria**

1.2 Doença arterial periférica

As doenças cardiovasculares representam as maiores causas de mortalidade da população ocidental adulta e estima-se que 5% da população com idade superior a 50 anos são portadores de DAOP.¹⁰⁻¹⁷ Isso significa o acometimento da circulação arterial dos membros inferiores por obstruções ao fluxo sanguíneo em decorrência do processo degenerativo ou não degenerativo da parede arterial.¹⁸⁻²⁰ Sua origem se deve ao processo de aterosclerose, ou seja, a formação de placas obstrutivas na circulação arterial, cuja etiologia se deve a associação de características próprias do envelhecimento com diversos fatores de risco.^{14,15} Entre os principais fatores de

risco estão a hipertensão arterial, idade avançada, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade, tabagismo, hiperuricemia, hiperomocisteinemia, entre outros.¹⁴ Essa patologia tem característica progressiva, apresentando-se clinicamente como causa de limitação para a caminhada, podendo chegar aos estados mais críticos da doença, onde o indivíduo passa a apresentar claudicação incapacitante, dor em repouso, úlceras de difícil cicatrização e progressão para gangrenas, com necessidade de amputações menores ou maiores (perda do membro acometido).^{14,15} Aproximadamente 20 a 30% dos portadores de DAOP em estado avançado não serão candidatos ao tratamento cirúrgico restaurador por qualquer dos métodos existentes.¹⁵ Em geral, isso se deve a gravidade da doença, afetando a circulação arterial troncular com extensão até os vasos de médio calibre, além do possível comprometimento da microcirculação.²¹ Além disso, casos em que o tratamento preconizado não obteve resultado satisfatório ou não duradouro, tornam-se os maiores desafios da cirurgia vascular atual. Para tanto, buscam-se novas técnicas e materiais como substituto vascular ideal, principalmente para restaurar a circulação abaixo do joelho, que exige pontes longas e de fino calibre.²²

1.3 Revascularização cirúrgica por enxerto ou bypass

Na prática cirúrgica cardiovascular, é bem estabelecido que para determinadas situações o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica, tanto coronariana, quanto periférica, requerem a realização de procedimento cirúrgico de revascularização com a realização de pontes, enxertos ou *bypass*.^{14,15,23} Basicamente, o substituto vascular ideal seria um vaso sanguíneo com as mesmas características da artéria que se deseja substituir.²⁴ Naturalmente, isso não é possível na maior parte das vezes, tendo em vista que a utilização de uma artéria autóloga pode promover isquemia do território doador. O substituto mais amplamente utilizado tem sido a veia safena magna autóloga, explantada no mesmo ato cirúrgico.^{25,26} Esse procedimento é considerado como o de melhor resultado em termos de patência, ou seja, perviedade sanguínea ao longo do tempo, para a cirurgia vascular periférica.²⁴ Na impossibilidade de se utilizar veias autólogas, como por exemplo, quando o paciente já foi submetido à safenectomia por insuficiência

venosa, quando esta veia se apresenta varicosa ou quando a mesma apresenta calibre muito reduzido e inadequado, pode-se utilizar substitutos arteriais sintéticos como próteses de Dacron® ou politetrafluoretileno (PTFE). Tais materiais não podem ser utilizados de forma irrestrita, principalmente devido a intolerância dos materiais sintéticos a infecções do sítio cirúrgico ou mesmo a distância.²⁷ Quando se pretende revascularizar artérias de pequeno calibre como artérias da perna ou dos pés, entre outros, há uma limitação para o uso de próteses, uma vez que, apresenta diminuição da patência nessas situações.^{14,15} Nestes casos, muitas vezes o cirurgião não tem muitas opções e acaba por realizar procedimentos com baixas patência, conhecidos como técnicas de salvamento de membros, o que pode resultar em altas taxas de insucesso e culminar com amputação. Nesses casos, a TEBV encontra vasto caminho de desenvolvimento como forma de auxiliar o cirurgião e aumentar a qualidade de vida para os doentes.

1.4 Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos

Desde 1987 pesquisadores vêm utilizando e aprimorando as técnicas de engenharia de tecidos para o desenvolvimento de substitutos cirúrgicos de diversos tecidos acometidos por doenças ou degeneração. Os primeiros relatos da utilização desta técnica, foi através de pesquisas que exploraram o potencial dessa tecnologia a partir de testes para produção de cartilagem, válvulas cardíacas, endotelização de pontes sintéticas, porém realizados de uma forma muito mais simples do que pudesse chegar a aplicação clínica definitiva.²⁸⁻³⁴

A engenharia de tecidos (ET) é uma nova tecnologia que combina células, conceitos de engenharia e material biológico/sintético como forma de reparar, substituir ou regenerar tecidos biológicos, com finalidade terapêutica.³⁵⁻³⁷ As principais aplicações vislumbradas para a ET em humanos são a produção de tecidos como: pele, osso, cartilagem, córneas, vasos sanguíneos, brônquio principal esquerdo, traqueia, estruturas urinárias entre outros.³⁵⁻⁴¹ Diversas estratégias são apresentadas em literatura como forma de vencer os desafios para o fornecimento de estruturas que sirvam como suportes ou *scaffolds* em ET, sendo necessário que

se atendam critérios sobre as características mais desejáveis para as diversas aplicações, incluindo características como: ser biodegradável; possuir resistência mecânica; ser altamente poroso; ser biocompatível e não ser citotóxico; não ser antigênico; ser promotor de adesão, proliferação e diferenciação celular; ser flexível e elástico; apresentar características tridimensionais (3D) semelhantes ao tecido que pretende substituir; ser osteocondutor no caso de substitutos ósseos; e suportar o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos.³⁵⁻³⁷

A ET em vasos sanguíneos é proveniente do termo em inglês *tissue engineering into blood vessels* (TEBV), cujo objetivo é o desenvolvimento de um substituto vascular ideal com semelhança na atividade biológica e estruturação de artérias ou veias para que possa substituir e restaurar de forma equilibrada as funções do tecido vascular danificado, principalmente pela aterosclerose.³⁵ Dessa forma, a TEBV busca gerar substitutos para os vasos sanguíneos que possam mimetizar as funções biológicas e a anatomia do tecido natural, sendo esta proposta mais aplicável para o tratamento substitutivo de artérias acometidas por aterosclerose, de forma mais apropriada para doentes portadores de DAOP, cujas limitações terapêuticas, hoje existentes, não conseguem diminuir o número de amputações de membros inferiores. Com essa alternativa, muitos doentes terão a possibilidade de receber tratamento cirúrgico baseado em medicina personalizada, com by-pass/pontes produzidas especificamente para eles, com células autólogas e com propriedades bioquímicas, mecânicas, e estruturais específicas, como espessura e comprimento, necessários para revascularização, resultando em pontes mais duradouras (maior de patência).^{8,41-44} A TEBV, fundamenta-se no desenvolvimento de *scaffolds* 3D tubulares, que sejam biocompatíveis e sirvam como substituto para o tecido vascular. Tais materiais podem ser obtidos de fontes naturais (vasos descelularizados ou macromoléculas do organismo, como colágeno e fibrina) ou sintéticas [polímeros biodegradáveis como o ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA)].⁴⁴ Entretanto, os *scaffolds* derivados de materiais naturais possuem algumas vantagens em relação aos sintéticos, pois tem a

capacidade de preservar a estrutura 3D , composição de matriz extracelular (MEC) e resistência mecânica, mantidas em relação ao tecido natural de origem.⁴⁴

A obtenção de *scaffolds* naturais, através da técnica de descellularização de tecidos, têm demonstrado excelentes resultados para aplicação na ET. A descellularização promove a remoção dos conteúdos celulares e nucleares das células do tecido, preservando assim a matriz extracelular, e minimizando os riscos de imunogenicidade.^{41,45} Apesar de tudo, ainda não existem protocolos padronizados e específicos para cada tecido submetido a descellularização, o que dificulta a reprodução da técnica e o escalonamento da produção dos *scaffolds* para uso clínico, mesmo que futuro.

A preservação da estrutura da MEC na descellularização (MECdesc) de tecidos, denominado como *scaffold* natural, fornece uma estrutura 3D simplificada para uso em ET e uma melhor interação entre as células e a MECdesc, o que teoricamente facilitaria crescimento celular e regeneração tecidual.⁴⁶ A MECdesc possui características específicas do microambiente celular ideal, possui alta biocompatibilidade e resistência mecânica e, por esse motivo, seria um meio microambiente propício para a colonização celular.⁴⁷⁻⁴⁹ A utilização de *scaffold* de MECdesc de diversos tecidos tem apresentado vantagens significativas em experimentos de semeadura, expansão e diferenciação celular *in vitro*, incluindo facilidades para obtenção dos fenótipos desejados, reversão da senescência e orientação da diferenciação celular de interesse.⁴⁷⁻⁵⁰ Mais importante ainda, as técnicas de utilização MECdesc como recursos para montagem de *scaffold* em ET promovem o desenvolvimento de estruturas semelhantes à *in natura*, principalmente relacionadas às propriedades biomecânicas e, portanto, os MECdesc vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas para a reconstrução de tecido ósseo, cartilaginoso, nervos periféricos, pele e vasos sanguíneos.^{47,49}

Embora existam pesquisas explorando diversas técnicas para o desenvolvimento da TEBV em busca de encontrar os melhores substitutivos vasculares para o tratamento de DAOP e outras doenças cardiovasculares, ainda não foi possível disponibilizar um produto adequadamente desenvolvido para testes

clínicos em maior escala, sendo necessário grande investimento em pesquisas para que essa ferramenta possa ser aplicada com segurança nos casos selecionados para isso, resultando em maiores taxas de salvamento de membros.

INTRODUÇÃO

1. Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos

O cultivo de células-tronco mesenquimais (CTM) e a descoberta de técnicas que promovem a sua diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a ET.^{50,51-60} As pesquisas com células-tronco avançam em territórios onde a medicina tradicional apresenta limitações, sendo conhecidos como fronteiras do conhecimento científico.⁴³ Dessa forma, essas pesquisas podem contribuir em solucionar situações específicas para os portadores de doenças cardiovasculares.⁴²

Um dos maiores desafios da TEBV é produzir *scaffold* tridimensionais (3D) biocompatíveis, tubulares, com um microambiente mimetizando a arquitetura natural do tecido *in vivo* e tenham características que favoreçam a adesão celular, a diferenciação celular, a permeabilidade de nutrientes através do tecido, a integração como tecido receptor, resistência às forças mecânicas do fluxo sanguíneo, entre outros.⁶¹⁻⁶⁶

1.1 Descelularização da veia

Os *scaffolds* a serem utilizados na TEBV podem ser biológicos, obtidos de tecidos naturais e descelularizados, ou sintéticos, obtidos pela manipulação de materiais absorvíveis como o ácido poliglicólico (PLG), o ácido polilático (PLA), entre outros, que podem ser configurados em estruturas tubulares tridimensionais (3D), como visto previamente.⁶⁷ Dentre as vantagens dos *scaffolds* sintéticos, sabe-se que estes não induzem reações imunogênicas, por outro lado, não há comprovação científica da persistência do suporte mecânico ao longo do tempo.⁶⁷⁻

70

A utilização do *scaffold* biológico apresenta algumas vantagens estruturais, tanto pela forma tubular 3D como pelas características próprias da MEC natural; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta uma adequada eliminação dos componentes celulares para se evitar uma possível reação imunológica no momento de aplicação no receptor do novo tecido.⁷¹ Antígenos

celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim podem induzir uma resposta inflamatória ou uma rejeição imunomediada do tecido transplantado e consequentemente expor o receptor aos riscos da perda do enxerto, inclusive risco de complicações que podem levar a óbito.^{72,73}

O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear imunogênicos, preservando a integridade estrutural e propriedades mecânicas da MECdesc, sendo considerado um ambiente propício para o repovoamento celular.⁶⁷ Além disso, durante o procedimento de descelularização, os agentes descelularizantes utilizados precisam ter um efeito residual mínimo, com a finalidade de não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo.⁶³ Os protocolos mais completos para um processo de descelularização incluem uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas, que podem ser reforçadas conforme as características biomecânicas do tecido que se pretende descelularizar.^{62,63}

Estudos experimentais prévios, realizados pela nossa equipe, demonstraram que, no caso específico do modelo animal escolhido (em coelhos), as veias cavas inferiores (VCI) podem ser descelularizadas, mantendo boa estruturação da matriz. Dessa forma, concluiu-se que estas são aptas a servirem como *scaffold* tubular 3D e capazes de receber e integrar-se com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (do inglês, *adipose-tissue derived stem cell* - ASC), inclusive com diferenciação em endotélio.⁶² Determinou-se também que o processo de descelularização da veia não acarreta toxicidade residual significativa ou perda das características essenciais da MEC.⁶³ Diante dos avanços obtidos, apresentamos a continuidade do modelo experimental que visa completar o desenvolvimento do método de TEBV e comprovar a segurança e eficácia da estrutura constituída por experimentos que serão melhor descritos a seguir através de testes experimentais *in vitro* e *in vivo* (modelo animal).

Neste caso, como se pretende utilizar o *scaffold* de veia cava inferior de

coelho descelularizada que se caracteriza por ser um tecido bastante delicado; o protocolo elencado como mais seguro e eficaz será a reprodução da técnica previamente padronizada nos estudos já realizados, com o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS).⁵⁴ O SDS é um composto orgânico com propriedades surfactantes (aniônicas). Dada a sua estrutura, esta molécula possui propriedades anfifílicas, sendo comumente utilizado na indústria de detergentes, com a finalidade de remover resíduos oleosos, mas também funciona como desnaturante de proteínas, além de outros usos.^{74,75}

1.2 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (ASCs)

As ASCs estão presentes em maior ou menor quantidade em todos os tecidos do organismo após a fase embrionária, sendo mais facilmente obtidas dos tecidos onde são mais abundantes, preferindo-se utilizar em pesquisa as encontradas em sangue de cordão umbilical⁷⁶, medula óssea⁷⁷ e tecido adiposo⁷⁸.

O tecido adiposo representa uma fonte de CTM com grande concentração celular, de fácil obtenção cirúrgica e praticamente isento de contraindicações para sua obtenção.⁷⁹ A fração do estroma vascular do tecido adiposo se tornou foco de investigações após a comprovação de que ele é capaz de fornecer as ASCs, que são multipotentes e altamente replicantes *in vitro*, apresentando, assim, vantagens potenciais para as aplicações na engenharia de tecidos.^{38,73,77-81}

Contudo, a preparação das células em laboratório para a cultura não é idêntica. A maioria dos pesquisadores isolam as ASCs obtidas de tecido adiposo através da metodologia onde os tecidos são digeridos com collagenase e o fracionamento é feito por centrifugação, permitindo sua expansão *in vitro*.^{82,83}

A Sociedade Internacional para Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy – ISCT, em inglês) estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como CTM: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar CD73, CD90 e CD105, não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α e os antígenos leucocitários humanos (HLA-

DR).^{76,82,83}

O uso dessas células em Medicina Regenerativa implica em isolamento e expansão sem a perda da capacidade de pluripotência.⁸⁴ Muitos estudos têm isolado as ASCs e têm controlado, *in vitro*, a sua diferenciação em diversos tecidos através de indução por fatores de crescimento específicos, com o objetivo de reparar tecidos lesionados.^{85,86}

1.3 Endotélio

A célula endotelial (CE) foi, por muito tempo, considerada somente como uma barreira anatômica de prevenção do extravasamento do sangue para o meio externo aos vasos sanguíneos.²¹ Posteriormente, descobriu-se que o endotélio vascular representa um sistema orgânico bastante complexo, metabolicamente ativo e que é capaz de manter a homeostase do organismo.²¹ Isso se faz através do seu controle sobre o tônus vascular, a regulação do transporte de solutos, o controle da indução do crescimento celular local, a deposição de matriz extracelular para protegê-lo contra as injúrias das substâncias transportadas pelo sangue, a regulação de respostas hemostáticas frente a injúrias de sua parede, as reações inflamatórias e reparadoras dos tecidos por onde passa.²¹ As CEs são histologicamente poligonais, uniformes, arranjadas em monocamada (como ladrilhos alongados), com ordenação paralela ao fluxo sanguíneo, medindo esta camada entre 25 e 50µm de largura, são achatadas e isoladamente podem medir até 3µm de espessura na região que contém o núcleo. Como característica específica, as CEs, além de conter todas as organelas comuns a outras células, apresentam uma organela especial chamada de corpúsculo de Weibel-Palade, que armazena o Fator de von Willebrand (FvW) e a p-selectina, importantes no controle de agregação plaquetária e adesão celular.⁸⁷

Um avanço fundamental para a compreensão da fisiologia vascular foi quando se demonstrou que CEs contribuem ativamente na modulação do tônus vascular atuando sobre o músculo liso da parede, através da produção e liberação de: fatores de contração (EDCFs) como endotelina-1 (ET-1), tromboxano A2 (TX-A2), prostaglandina H2 (PGH2), e ânions superóxido; e fatores de relaxamento

(EDRFs) como prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e óxido nítrico (NO), permitindo o desenvolvimento de fármacos, principalmente para o controle da hipertensão arterial sistêmica (HAS).²¹

Normalmente, há predomínio na liberação de EDRFs pelo estímulo de neurotransmissores, hormônios, substâncias derivadas das plaquetas e do sistema de coagulação, EDRFs e pela tensão de cisalhamento do próprio fluxo sanguíneo.^{88,89} O NO é o mediador primário da vasodilatação.⁹⁰ Assim, o endotélio intacto, frente à agregação plaquetária, libera EDRFs que atuam no músculo liso promovendo a inibição da perpetuação do processo, atuando como um *feedback* negativo.⁹⁰

As CEs, além de sua interface com carga negativa antitrombótica, produzem substâncias que atuam na regulação da coagulação sanguínea como a substância ativadora do fator VII, FvW, antitrombina (antitrombina III), macroglobulina- α 2, tromboplastina inativada e possui em seu glicocálice de membrana celular sulfato de heparan.²¹ Produz enzimas que participam de importantes reações anabólicas e catabólicas do organismo, como oxirredutores, hidrolases, adenilciclases, descarboxilases, monaminoxidase e colinesterase, além de apresentar receptores para numerosos agentes vasoativos como a noradrenalina, acetilcolina, 5-hidroxitriptamina, propranolol, angiotensina II e histaminas. Produzem ainda, quando estimuladas, moléculas de adesão leucocitária (*Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule* - ELAMs) que tem grande importância nos fenômenos inflamatórios.^{90,91}

1.4 Músculo liso vascular

Os vasos sanguíneos são histologicamente formados por três camadas, internamente a túnica íntima, túnica média e externamente a túnica adventícia.⁹²

A composição de cada camada é variável de acordo com o tipo e calibre do vaso.⁹² A parede vascular, com exceção dos capilares, apresenta uma arquitetura complexa e propriedade mecânica única, estruturada a partir de três tipos de células: CE na túnica íntima; células musculares lisas (CML) na túnica média; e fibroblastos

na túnica adventícia, além de outras células de permeio. Dentre elas, as CE e as CML têm papel principal na manutenção da integridade, propriedades mecânicas e função do vaso sanguíneo.⁹²

Levando-se em consideração as artérias de grande e médio calibre, conhecidas como artérias elásticas, estas apresentam a seguinte conformação: túnica íntima - contendo o endotélio, subendotélio e lâmina elástica interna; túnica média – contendo células musculares lisas organizadas de forma helicoidal, fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III e IV), proteoglicanas e glicoproteínas e lâmina elástica externa; túnica adventícia – consistindo de colágeno tipo I e fibras elásticas, se continuando com o tecido conjuntivo no qual o vaso está inserido.⁹² Como parte fundamental da homeostase do vaso sanguíneo a relação entre as CE e as CML mantém o tônus vascular. Dessa forma, pretende-se que o neovaso produzido por ET possua uma camada muscular organizada e suficiente para a anastomose em uma artéria elástica.

Além disso, deve se levar em consideração que a funcionalidade vascular é representada não somente por suas características morfofuncionais, mas também pela sua capacidade de reação frente a estímulos bioquímicos endógenos, o que pode ser avaliado *in vitro* através de testes de reatividade vascular frente a estímulos farmacológicos, visando o desempenho na sua contração e relaxamento, de forma dependente ou não da ação do endotélio.⁹³⁻⁹⁵

As CMLs têm a principal função de dar suporte para a estrutura do vaso sanguíneo, bem como, manter a pressão intravascular e a perfusão tecidual através da regulação do tônus vascular. As CMLs apresentam mais plasticidade do que outros tipos de células, devido a diferentes funções do tecido, incluindo contração, proliferação e síntese de MEC.⁹⁶

Diante de condições fisiopatológicas, ou seja, remodelação vascular ocasionado por uma disfunção ou dano endotelial do tecido, as CMLs migram para a região e se multiplicam para contribuir com o restauro da lesão neointimal, entretanto, evidências científicas sugerem que o recrutamento excessivo células-

tronco/progenitoras encontrados no vaso são responsáveis pelo acúmulo de CML na íntima durante a remodelação vascular, podendo ocasionar hiperplasia neointimal e arteriosclerose. Portanto, entender os mecanismos regulatórios que controlam a diferenciação de CML de progenitores vasculares é essencial para explorar alvos terapêuticos para potenciais aplicações clínicas.⁹⁷

As CML que se originam da diferenciação embrionária demonstram altas taxas de proliferação e migração celular, no entanto, produzem uma grande quantidade de proteínas e fatores da matriz extracelular, que são diferentes daqueles secretados por CML adultos imaturos, mas necessários para que ocorra a angiogênese vascular.⁹⁸

No desenvolvimento do músculo liso, é necessário o envolvimento de várias vias de sinalização, como, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) que são quimioatrativos e auxiliam na migração de células murais que expressam o receptor de PDGF- β e desempenham múltiplas funções na proliferação ou diferenciação.⁹⁷ O proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) atua na expressão transitória do marcador inicial do mesoderma, como na indução de fatores de transição cardíaca e diferenciação em cardiomíócitos.⁹⁹⁻¹⁰²

Com tudo, para estabelecer uma estratégia para obter célula de músculo liso vascular (VSMC), de origem autóloga, é altamente desejado na TEBV para produção de vasos sanguíneos funcionais, porém realizar isso de forma autóloga através de vasos maduros nem sempre é possível.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Portanto, a indução bioquímica com utilização de fatores de crescimento é uma estratégia utilizada para diferenciar ASCs em células contráteis semelhantes a VSMC e manter seu fenótipo VSMC para reconstrução de tecidos.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Por outro lado, as vias moleculares envolvidas em todos esses processos são extremamente complexas e intrincadas, sendo fundamental a evolução nesse campo para melhores resultados em TEBV.

1.5 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são ribonucleotídeos (RNAs) pequenos, de aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, não codificadores, que atuam na regulação da expressão gênica. Os miRNAs estão envolvidos em inúmeros processos como controle de genes associados ao ciclo celular, proliferação e diferenciação celular entre outros processos.¹⁰⁸⁻¹¹⁴ Os miRNAs atuam por meio de complementaridade de bases com moléculas de RNA mensageiro (mRNA), podendo esta ser parcial ou total com a sequência-alvo de um ou mais RNAs mensageiros. A ligação ocorre entre a região 5' UTR (do inglês, untranslated region – UTR) de uma molécula de miRNA com a região 3' UTR de um mRNA, em sequências de nucleotídeos no mRNA denominadas “seed”.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Os miRNAs geralmente levam à repressão pós-translacional da expressão gênica, por meio de clivagem de mRNA ou deadenilação.^{109,110} Uma característica importante dos miRNAs é a capacidade de ligação e controle da expressão de vários mRNAs-alvo, simultaneamente, sendo que um mesmo mRNA-alvo também pode ter sua regulação gênica controlada por diferentes miRNAs.¹¹⁴ Adicionalmente, os miRNAs possuem especificidade tecidual, sendo que nem todos os miRNAs encontram-se expressos nos mesmos tecidos.¹¹⁷⁻¹²⁰

Os miRNAs desempenham papel na regulação de genes envolvidos nos processos de autorrenovação e diferenciação celular. Portanto, atuam no controle pós-transcricional de genes específicos das CTM associadas ao sistema vascular, diferenciação e desenvolvimento do sistema cardiovascular.¹²¹⁻¹²³ De fato, estudos indicam que alterações em miRNAs podem resultar no comprometimento, de moderado a grave, do desenvolvimento do sistema cardiovascular.¹²³ Há relatos do papel de miRNAs específicos na diferenciação de células-tronco em células endoteliais vasculares ou na regulação da expressão gênica de células endoteliais; tais miRNAs incluem miR-99b, miR-181a, miR-181b, miR-6086, miR-6087 e miR-5739. No entanto, o papel dos miRNAs na diferenciação de células endoteliais e no desenvolvimento do sistema cardiovascular ainda precisa ser melhor elucidado, bem como seu envolvimento em doenças vasculares.¹²⁴⁻¹²⁶

Enxertos vasculares produzidos através da TEBV, se mostram uma fonte não limitada de suprimentos e podendo oferecer compatibilidade imunológica, resistência, capacidade de remodelação e autorreparação.¹²⁷ A produção de um neovaso funcional a partir de um *bioscaffold* por TEBV apresenta um equilíbrio delicado de regulação biomolecular, envolvendo as vias de migração, proliferação e diferenciação celular, sendo que muitas dessas vias são controladas por miRNAs, que em desarranjo podem levar a problemas após o implante, como hiperplasia neointimal e/ou estenose/oclusão.¹²⁸⁻¹³⁴

Com base embriológica, mas também reparadora, a angiogênese é responsável por controlar os processos fisiológicos normais e patológicos, regulando vários eventos de sinalização molecular e garantindo a interação entre vários tipos de células, tendo como principais etapas ativação de células endoteliais, degradação enzimática da membrana basal capilar, proliferação de células endoteliais e migração direcionada, fusão de vasos, diminuição e estabilização dos pericitos e formação da rede capilar.¹³⁵⁻¹³⁸ Este processo ocorre através dos reguladores angiogênicos e moléculas sinalizadoras, incluindo fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), Fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), Interferon, Metaloproteinase de matriz-1/9 (MMP-1/9); através de seus estimuladores angiogênicos como Angiogenina, Angiopoietina, Fator de crescimento transformador α/β (TGF α/β). Além do controle negativo, através de inibidores angiogênicos como a Angioarrestina, Interleucina 12, fragmento de fibronectina e Angiostatina.¹³⁵⁻¹³⁸ Direta ou indiretamente, a angiogênese é regulada através da expressão de miRNAs.^{139,141}

Os miRNAs também atuam na regulação do processo fisiológico ou patológico da regulação vascular, tanto na sinalização para a adesão e proliferação celular, captação e fluxo de lipídios e geração de mediadores inflamatórios, fornecendo novos *insights* biomoleculares sobre a aterosclerose e possíveis alvos terapêuticos.¹²⁵ Em resposta a lesão e outros estímulos, os níveis de expressão de

proteínas contráteis são diminuídos e os níveis de expressão de proteínas em proliferação são aumentados nas células do músculo liso vascular (VSMCs); essas alterações levam ao aumento da proliferação celular e tem papel na patogênese de várias doenças cardiovasculares, incluindo reestenose vascular após angioplastia.^{134,142}

Certos miRNAs como miR-126, miR-221/222, miR-17-92 cluster, miR-93, let-7f, miR-214 são relatados para modular a resposta do endotélio vascular a estímulos angiogênicos.¹³⁵ O termo angiomiRNAs foi proposto para miRNAs que regulam a angiogênese.¹³⁸⁻¹⁴⁴ Vários miRNAs são encontrados para ter expressão ectópica apenas em CE com expressão específica apenas em células de linhagem endotelial.¹⁴⁵ Esses miRNAs afetam a angiogênese interagindo com várias moléculas-chave em diferentes tipos de células (Tabela 1).

Tabela 1. miRNAs pró-angiogênicos e anti-angiogênicos ^{140,143, 146-157}			
Tipo	miRNA	Alvo	Função
Pró-angiogênico	miR-126	SPRED-1, PIK3R2, VECAM-1	Promove a sinalização AKT e ERK dependente de VEGF desreprimindo o p85
	miR-210	Ephrin-A3	Estimulação da formação do tipo capilar e quimiotaxia EC em resposta ao VEGF
	miR-10b and 9b	HOX Pathway	Aumentar a proliferação de células endoteliais em resposta ao VEGF
	Let-7b, 7f	Let-7b: TIMP1 Let-7f: TSP-1	Regular a formação de brotos
	miR-132	p120RasGAP	Facilita a proliferação de células endoteliais ao regular negativamente p120RasGAP
	miR-378	Sufu, Fus1	Promove a migração de células endoteliais, formação de tubos e angiogênese tumoral in vivo
	miR-17-92 cluster	TIMP1, TSR, VEGF	Promover a divisão celular endotelial, migração
Anti-angiogenic	miR-24	GATA4, PAK 2	Inibe a angiogênese
	miR-195	VEGF, VAB2, CDC 42	Suprime a angiogênese e a metástase no carcinoma hepatocelular
	miR-221/miR-222	c-kit, eNOS	Inibe a migração e proliferação da célula endotelial
	miR-328	CD 44	Reduz a formação de estrutura capilar
	miR-15b/miR-16	VEGF	Induzir apoptose celular
	miR-192	EGR1, HOXB9	Reduz globalmente a via angiogênica

Dessa forma, o estudo dos miRNAs envolvidos na angiogênese, na aterosclerose e nas várias funções vasculares podem contribuir com a elucidação das bases biomoleculares normais e patológicas dos vasos sanguíneos, contribuindo

sobretudo com a TEBV e sua evolução para atender ao que se propõe.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Notadamente, as pesquisas em TEBV se preocupam em produzir um substituto vascular biocompatível, personalizado e otimizado para o tratamento substitutivo de vasos acometidos por doenças, especialmente a aterosclerose. Sabe-se que as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade da sociedade ocidental adulta. Para a cirurgia cardíaca, a TEBV atenderia casos onde esgotaram-se as possibilidades endovasculares e não há um substituto vascular autólogo disponível, já que materiais sintéticos são pouco compatíveis em pontes coronarianas. Para a cirurgia vascular periférica, a TEBV atenderia doentes onde os procedimentos endovasculares sabidamente não apresentam bons resultados, situações onde não há vasos autólogos em comprimento ou qualidade para a confecção de pontes, doentes portadores de infecções de sítio cirúrgico ou a distância e que não tenham substitutos autólogos ou em outras situações terminais. A TEBV poderia entregar um substituto biocompatível, personalizado, com alta patência em razão de ser endotelizado, com possibilidade de interação com os tecidos por onde forem implantados, ser tolerante às infecções e apresentar células com alto poder regenerativo por serem bastante imaturas frente ao processo evolutivo. Ainda, do ponto de vista acadêmico, ao realizarmos uma abordagem em nível biomolecular, espera-se que os achados referentes às vias de sinalização na construção do neovaso possa contribuir com o esclarecimento dos intrincados mecanismos envolvidos na angiogênese. Por fim, esse trabalho permitiu a evolução da equipe envolvida nos processos de ET na fronteira do conhecimento científico, permitindo que avancemos em direção ao que há de mais moderno na ciência mundial. Esperamos que, em um futuro breve, seja possível realizar a transposição dos modelos experimentais para que se possa tratar o ser humano com técnicas de TEBV com segurança.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir, através de um modelo experimental em coelhos, um protótipo de neovaso sanguíneo, *in vitro*, utilizando-se um *scaffold* de veia cava descelularizado e usando técnicas de ET, recelulariza-lo, internamente com a semeadura de CTM induzidas a se diferenciarem em endotélio e externamente com CTM diferenciadas em ML.

3.2 Específicos

- Induzir e comprovar histologicamente a diferenciação de CTM em endotélio aderido ao *scaffold*;
- Induzir e comprovar histologicamente a diferenciação de CTM em CML (estímulo por fatores de crescimento celular);
- Promover a adesão do CML na face externa do neovaso;
- Comprovar histologicamente a presença de CE e CML no neovaso produzido;
- Realizar análise do miRNA nos *scaffolds* recelularizados;
- Análisar o meio de cultura induzido (sobrenadante de cultura do neovaso) para a presença de citocinas.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O projeto foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

4.2 Procedimentos éticos

O projeto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMB-UNESP, registrado com o número de protocolo CEUA 1279/2018 - SIPE-FMB 342/2018 (ANEXO 2).

4.3 Animais e condições de alojamento

Foram utilizadas 30 coelhas, adultas, não prenhas da raça Nova Zelândia, linhagem Botucatu (para a realização de todos os experimentos ao longo de 3 anos). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com as seguintes dimensões: largura de 45cm; profundidade de 60cm; e altura de 40cm, no alojamento de coelhos da UNIPEX, que apresenta luminosidade controlada (12h luz, 12h sem luz), umidade e temperatura controlados, além de exaustão do ar. Foi realizado o enriquecimento ambiental para melhoria da qualidade de vida dos animais através da colocação de um pequeno tubo de PVC em cada jaula para que os animais pudessem se distrair e brincar. A dieta era composta de ração peletizada e balanceada, juntamente com a oferta de água a livre demanda (*ad libitum*).

Foram utilizados os mesmos animais (coelhos) para a coleta dos tecidos utilizados nos experimentos (veias cavas inferiores e tecido adiposo), evitando-se o uso exagerado de animais.

4.4. Grupos

De forma resumida, para maior entendimento dos experimentos que foram

realizados, demonstram-se os grupos experimentais:

- **Veia Cava inferior *in natura* (VCI)** – fragmentos de 1,0cm de veia cava *in natura*, grupo controle positivo (n=5);
- **Scaffold de veia descelularizada (VD)** – fragmentos de 1,0cm de veia cava descelularizadas, grupo de controle negativo (n=5);
- **Neovaso com ASC diferenciadas em CE (NV)** – fragmentos de 1,0cm de veia cava descelularizadas e recelularizados com ASC e diferenciados em endotélio, grupo teste (n=5);
- **Neovaso com ASC diferenciada em CE e CML (NV-CE/CML)** – fragmentos de 1,0cm de veia cava descelularizadas e recelularizados com ASC e diferenciados em endotélio e músculo liso, grupo teste (n=5);

4.5 Eutanásia, manipulação e procedimentos

4.5.1 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados antes dos procedimentos de coleta de tecido. Para isso, foram sedados com ketamina 10 mg/kg (Dopalen[®], 100 animais receberam uma combinação intramuscular de ketamina 10 mg/kg (Dopalen[®], 100 mg/mL, Paulínia, SP, Brasil), cloridrato de xilazina 3 mg/mL kg (Anasedan[®] 2%, 20 mg/mL, Paulínia, SP, Brasil)mg/mL, Paulínia, SP, Brasil), cloridrato de xilazina 3 mg/mL kg (Anasedan[®] 2%, 20 mg/mL, Paulínia, SP, Brasil) e em seguida eutanasiados com sobredose (dose letal), intravenosa, de pentobarbital 150mg/kg, como preconizado pelo Manual Fiocruz – Fármacos em Animais de Laboratório, e segundo as “Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA”. A morte foi verificada pela ausência de movimento respiratório (apneia); ausência de batimentos cardíacos (assistolia), preferencialmente, por meio do uso de estetoscópio, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneano por um profissional qualificado, seguindo as Diretrizes para a prática de Eutanásia do CONCEA.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados seguindo rigorosa técnica de antisepsia, utilizando campos cirúrgicos, luvas e materiais cirúrgicos estéreis.

Após o término dos procedimentos, as carcaças dos animais foram congeladas e encaminhadas para incineração.

4.5.2 Obtenção de veias cavas de coelhos

Para obtenção das VCI, o abdômen do animal foi tricotomizado e foi realizada a assepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I). As VCI foram coletadas através de uma laparotomia xifo-púbica e dissecação delicada da veia cava desde o seu segmento mais distal até a veia renal mais baixa. As tributárias foram isoladas e seccionadas sem ligadura para não comprometer os resultados da descelularização. Por fim, as VCI foram lavadas interna e externamente com soro fisiológico 0,9% com heparina não fracionada 1000UI/100ml para retirada do máximo de sangue residual. As VCI foram seccionadas e acondicionadas em tubo Falcon estéril 50ml contendo PBS e transportadas para o Laboratório de Engenharia Tecidual e Celular da UNIPEX (LETC UNIPEX) da FMB UNESP.

A. Descelularização das VCI

Em câmara de fluxo laminar, ambiente estéril, as veias foram separadas em fragmentos de aproximadamente 1cm de comprimento (3 fragmentos para cada unidade) para serem submetidas à descelularização, isto é, a remoção das células e dos antígenos dos doadores. O protocolo de descelularização seguiu a técnica pré-estabelecida em nosso laboratório, com SDS 1% em agitação contínua por 2 horas (em Shaker *News Brunswick Scientific*® com temperatura controlada em 37°C) sendo estabelecido intervalo máximo de 2 dias entre a coleta e a descelularização.^{62,63} Após completar o processo de descelularização, os *scaffolds* foram lavados com soro fisiológico 0,9% por 10 minutos, trocando as amostras de tubo pelo menos 5 vezes, para a eliminação dilucional do SDS.(Anexo 1) Os fragmentos foram acondicionados e conservados em geladeira à 4°C em solução

tampão estéril contendo antibiótico e antifúngico (anti-anti) (penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 25 mg/mL de anfotericina B (2 mmol/L de 1-glutamina; Invitrogen™, Waltham, MA, EUA)) até o momento do uso em cultura. Cinco *scaffolds* foram, então, fixados em formalina a 10% durante 48h e encaminhados ao laboratório para confecção de blocos de parafinas e cortes para confecção de lâminas em HE para controle da descelularização.

B. Caracterização Histológica dos scaffolds

A confirmação da remoção celular e integridade da matriz extracelular (MEC) após o processo de descelularização foi realizado através da análise de 10 campos aleatórios de cada lâmina histológica em HE, aplicando-se ampliação de 400X (n=3), por dois avaliadores independentes. Contaram-se núcleos celulares e classificou-se a descelularização, segundo um score de qualidade, sendo considerado: ótimo (1) quando não apresentava nenhum núcleo celular; resultado intermediário (2) quando apresentava 1 a 3 núcleos íntegros presentes; resultado insatisfatório (3) quando indetificados 4 a 50 núcleos íntegros presentes; e resultado não responsivo (4) quando apresentava mais de 50 núcleos íntegros no campo analisado. Para a avaliação da MEC, foi utilizado um escore adaptado, sendo: ótima - na ausência de áreas de ruptura da MEC; insatisfatória - quando uma ou mais áreas de ruptura da MEC fossem observadas.

4.5.3 Obtenção do tecido adiposo

Foi retirada uma amostra de aproximadamente 2g de tecido adiposo (TA) da região dorsal interescapular de cada animal doador, através de uma pequena incisão longitudinal de 2cm de comprimento. As amostras foram transportadas em frascos cônicos com solução HEPES para o LETC-UNIPLEX.

A. Expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo autóloga.

No LETC-UNIPLEX, o tecido adiposo foi processado, em ambiente estéril, com lavagens sucessivas de solução de soro fisiológico estéril (SF) suplementado com anti-anti para retirada de qualquer resíduo contaminante que possa ficado na

amostra. A amostra de TA era armazenada por 24h em tubo cônico de 50mL com *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) e anti-anti em geladeira, à 4°C.

Após 24h, as amostras foram submetidas ao processo de fragmentação mecânica, pesadas e adicionadas em tubo falcon com meio de cultura (sendo 2mL de meio para cada 1g de tecido adiposo), em seguida foi realizado a dissociação enzimática com a aplicação de 2mg da enzima colagenase (*Invitrogen®*) para cada 1mL de meio de cultura utilizado. Esse processo foi realizado colocando-se as amostras já preparadas em incubação durante 15h à 37°C em incubadora com jaqueta de água e CO₂ 5% (*Thermo Class 100®*). Após este período, a ação da enzima foi neutralizada com adição da mesma quantidade, existente no tubo Falcon com o TA e colagenase, de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e o conteúdo foi centrifugado a 1200rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido contendo as células linfomononucleares era ressuspensionado em DMEM e procedida nova centrifugação.

O novo *pellet* era ressuspensionado em 1mL de DMEM, retirando-se alíquota de 30uL para contagem celular em câmara de Neubauer para a verificação do percentual de viabilidade celular e estimar o número total de células obtidas. A solução contendo as células era plaqueada em frascos de cultura de 25cm² de área (*Nunc®*) com adição de 4mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e anti-anti.

Os frascos de cultura eram mantidos em incubadora de CO₂ 5% à 37°C, com trocas de meio de cultura a cada 48h. O monitoramento das culturas era realizado por vigilância periódica (3x/semana) através de microscopia invertida (microscópio *Axiovert 200®*, *Zeiss™*), a cada troca de meio. A partir do momento em que se observava confluência superior à 80% da área da placa, era considerado o momento de realizar a ampliação do número de frascos para não inibir o crescimento celular, momento este chamado de “passagem”. As células eram destacadas do frasco de cultura com uso de 0,25% de tripsina para cada 1mm (*thylenediaminetetraacetic acid*) (*Tryple Gibo™*), contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos

de 75cm² (NuncTM). A seleção e purificação das células iniciais para ASCs se faz com as trocas de meio de cultura e com as passagens celulares, sendo melhores a partir da segunda passagem. Após a terceira passagem em tripsina, as ASCs eram criopreservadas em nitrogênio líquido na temperatura de -196°C (compondo o banco de ASC) com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC BiotecnologiaTM) com SFB, ou eram diretamente utilizadas para os procedimentos de diferenciação celular.

A caracterização das ASCs do ponto de vista fenotípico foi realizada pela expressão de marcadores positivos (CD90, CD71, CD106) e negativos (CD11b, CD31 e CD45) pela metodologia de imunofenotípica em citometria de fluxo. Para isso, foi utilizado o equipamento *Facscalibur BD*® e o software *Cell Quest*. Além da citometria de fluxo, foram utilizadas as técnicas de diferenciação das ASC em 3 diferentes tecidos: cartilagem, gordura e osso, além de mapeamento molecular com uso do kit StemPro adipogenesis, condrogenesis e osteogenesis (Invitrogen).

B. Contagem e viabilidade celular

A contagem e viabilidade celular foram realizadas a cada etapa de passagem celular com o objetivo de quantificar a percentagem de células viva e mortas. Foi utilizado neste processo uma alíquota de 30ul de corante de Azul de tripano em cada amostra de 30ul de cultura de ASC, onde as células mortas sofrem alterações na permeabilidade da membrana, apresentando a coloração azulada, desta forma podendo identificar as células viáveis e não viáveis. A contagem celular é realizada na câmara de Neubauer, para calcular o percentual de células viáveis.

4.6. Experimentos de diferenciação celular

4.6.1 Semeadura de ASC

A. Lúmen do scaffold

Os *scaffolds* receberam em sua luz interna (lúmen) uma solução de 5µL de *Puramatrix*® preparada com ASC conforme será melhor descrito para cada grupo,

a seguir. A solução foi aplicada com auxílio de micropipeta para aplicação direta na luz interna do *scaffold*. Um fio guia plástico rígido estéril de 0,5mm de diâmetro serviu de apoio na luz do *scaffold* para a distribuição homogênea das células sob toda a superfície da parede da luz interna do *scaffold*. Os *scaffolds* contendo a solução de *Puramatrix*® e ASC foi mantido em uma placa de Petri de 40X30mm para gelificação, a qual foi induzida pela adição de 30µL de meio de cultura DMEN que contém cloreto de sódio (NaCl), por 30 minutos.

Após a gelificação, cada fragmento foi colocado em um poço de uma placa de cultura de 24 poços não aderente (*Corning*® *Costar*® *Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate*), sendo cada grupo indentificado por representação escrita na tampa da placa, sendo cada poço completado com 3 ml de meio de cultura de acordo com cada grupo. As placas de cultura foram mantidas em incubadora 5% CO₂, de forma controlada, à 37°C, com troca de meio de dois em dois dias.

4.7. Adesão celular ao scaffold 3D.

Foram constituídos dois grupos com 5 repetições para o estudo da melhor proporção de ASCs para adesão ao lumen do *scaffold*:

- **Grupo 1:** VCI desc. SDS 1% 2h + ASC 1×10^5 (n=5);
- **Grupo 2:** VCI desc. SDS 1% 2h + ASC 1×10^6 (n=5);

Conforme descrito anteriormente, as ASCs foram semeadas no lúmen do *scaffold* com meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, com trocas de meio de cultura de 2 em 2 dias, mantido em cultura por 21 dias, os fragmentos foram coletados. Uma parte foi enviada para histologia em HE e a outra parte foi criopreservada em nitrogênio líquido para realização de imunofluorescência com *4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride* (DAPI), que marca os núcleos celulares em azul. Em seguida cada corte histológico teve a contagem de núcleos em 10 campos diferentes por microscopia de fluorescência (DAPI) e por microscopia óptica (HE). O protocolo que apresentou a melhor taxa de contagem celular (melhor aderência celular) foi elencado para dar sequência nas próximas fases do experimento.

4.8 Endotelização do scaffold de veia cava inferior

Foi constituído de dois grupos com 5 repetições, obtido do melhor resultado obtido no experimento anterior, com uso de meio de cultura DMEM + 10% SFB e em 3 tempos diferentes (2 semanas; 4 semanas; e 8 semanas), a saber:

- **Grupo 1:** Controle – apenas o protocolo elencado anteriormente (n=5);
- **Grupo 2:** Endotélio – protocolo elencado anteriormente + suplementação com 5% SFB, 10ng/mL VEGF, 50ng/mL bFGF, 20ng/mL IGF, 20ng/mL EGF (n=5);

Esse experimento proporcionou a diferenciação das ASC aderidas ao lúmen do *scaffold* em endotélio, graças a adição dos fatores de crescimento para endotélio desde o início da cultura, conforme apresentado. As placas de cultura foram mantidas em incubadora 5% CO₂, de forma controlada, à 37°C, com troca de meio de dois em dois dias.

Ao final do experimento, foram confeccionadas lâminas para imunohistoquímica: anti-CD31, anti-CD105, anti-CD141 e anti-CD144.

Os resultados da endotelização foram avaliados de forma qualitativa (marcação celular por imunohistoquímica) e quantitativa (por score de contagem celular em 10 campos visuais por lâmina). Assim foi possível adeterminação de qual seria o menor e melhor tempo para diferenciação endotelial.

Com base nesse resultado, seguiu-se o próximo experimento, com adição da camada muscular.

4.9 Diferenciação celular em músculo liso

Para a obtenção das ASC diferenciadas em CML, utilizamos culturas previamente expandidas de ASC, que foram tratadas da seguinte forma: meio de cultura M199 suplementado com 5% SFB, 2,5 ng/mL de BMP4 recombinante humano e 5 ng/mL de TGF-1. Essa cultura foi mantida por 2 e 3 semanas, com trocas de meio de 2 em 2 dias. As células musculares produzidas foram destacadas do frasco de cultura com tripsina para uso na etapa de semeadura sobre o *scaffold* endotelizado e uma amostra foi destinada a análise de imunohistoquímica,

confeccionando-se um “pellet” celular.

4.10 Semeadura do músculo liso no scaffold endotelizado

Foram constituídos dois grupos com 5 repetições, seguindo o melhor resultado obtido na Endotelização do *scaffold* em 2 tempos diferentes (2 semanas; 4 semanas), objetivando-se o neovaso com os dois principais componentes celulares

- **Grupo 1:** Controle – apenas o protocolo elencado anteriormente com a diferenciação endotelial (n=5);
- **Grupo 2:** Endotélio + CML – protocolo elencado anteriormente + semeadura de 1×10^6 células musculares lisas (CMLs) na face externa do vaso (n=5);

Encerrando-se o processo de endotelização, cada *scaffold* recebeu 1×10^6 CML diluídas em 20µL de Puramatrix® sobre a superfície externa do *scaffold*. A solução foi aplicada com auxílio de micropipeta e os neovasos foram mantidos em uma placa de Petri de 40X30mm para gelificação conforme descrito anteriormente. Após o término da gelificação, os neovasos foram transferidos para placas de cultura de 24 poços e mantidos em cultura com meio, trocas de meio de 2 em 2 dias: para o grupo 1 – controle: M199 + 10% de SFB e para o grupo 2 – Endotélio + CML: M199 + 10% de SFB suplementado com 10ng/mL VEGF, 50ng/mL βFGF, 20ng/mL EGF, 2.5 ng/mL BMP4, 5 ng/mL TGF1, por 2 e 4 semanas.

O experimento foi encerrado e as amostras foram analisadas por histologia, imunohistoquímica, imunofluorescência e análise do perfil global de miRNA e o meio de cultura condicionado (sobrenadante) foi coletado para análise de citocinas.

4.11 Determinação do perfil de interleucinas no sobrenadante

As amostras de sobrenadante de cultura foram coletadas de 48 em 48 horas, a cada troca de meio de cultura. As amostras foram aliquotadas em microtubos de centrifugação tipo Eppendorf com 1000µL e foram congeladas em freezer -80°C para análise em conjunto ao término do experimento.

Resumidamente, a técnica consistiu na identificação de anticorpos e ou antígenos marcados com uma enzima, que age sobre um substrato formando um

produto colorido através de reação enzimática com adição de peroxidase (H_2O_2), que foi quantificado por determinação espectrofotométrica. As etapas do ensaio consistiram em adicionar a amostra que contém os antígenos-alvo em uma microplaca ELISA (96 poços) que já contém o anticorpo específico adsorvido (anticorpo primário – anticorpo alvo). Em seguida a placa foi selada para se proceder a incubação, obedecendo sempre o tempo e a temperatura de incubação orientado pela bula do kit fornecida pelo fabricante. Após o tempo de incubação, o excesso de antígenos (antígenos que não reconheceram o anticorpo) foi retirado por lavagem, utilizando-se uma lavadora automática de microplacas (*ELx 50 Biotek*). Feito este procedimento, foi adicionado um segundo anticorpo marcado com uma enzima específica (anticorpo secundário) para se ligar ao primeiro complexo formado (complexo anticorpo primário + antígeno + anticorpo secundário). Novamente a placa foi selada para nova incubação por tempo recomendado pelo fabricante do kit. Após o período da segunda incubação, uma segunda lavagem foi procedida com a mesma finalidade e da mesma maneira que a primeira. Feita a lavagem, foi adicionado o agente cromógeno (substrato TMB - incolor), que ao ser oxidado pela enzima (peroxidase) gera um produto de cor azul (essa etapa deve ser protegida da luz). Em seguida, foi adicionado uma solução *stop* (ácido), que promove a mudança da reação para amarelo, cuja absorbância é melhor detectada pelo leitor de microplacas. Em seguida a placa foi colocada no leitor de microplacas para ELISA (Synergy/HT, marca Biotek) e ao final da leitura foi possível a quantificação da interleucina testada no sobrenadante em análise. Esse processo foi repetido para cada interleucina testada (TNF alpha, IL10, IL6, PDGF).

4.12 Análise do perfil global de expressão de miRNA

Os fragmentos de veia in natura, neovaso e ASC provenientes de cultura celular foram utilizados para análise do perfil global de expressão de miRNAs. Esta análise teve como objetivo avaliar as vias de expressão genética específicas encontrados nos *scaffold* recelularizados em comparação com controles positivos (veia in natura) e negativos (ASCs), com foco nas vias relacionadas a diferenciação

e função do endotélio e do músculo liso.

A. Extração de RNA

Os fragmentos dos *scaffold* vasculares e fragmentos *in natura* congelados foram homogeneizados em 1000µL de *Trizol*, *separadamente*, utilizando-se um homogeneizador (proporção 1:1 Tecido/*Trizol*). A mistura foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi acrescentado um volume de 200µL de clorofórmio por 1 ml de reagente TRIzol® Reagent, homogeneizando por inversão, e incubando por 3 minutos. Após 3 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C.

A seguir, aproximadamente 500µL do sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo de 1,5mL para o processo de isolamento do RNA. As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol após incubação por 10 minutos e foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos, a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000µL de etanol (75%) por 1000 µL TRIzol® Reagent e homogeneizadas em vórtex 7500g por 5 minutos, após descartado o sobrenadante e secar o *pellet* à temperatura ambiente.

Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 50µL de água livre de *RNase*, e solução de SDS 0,5%. A solução foi incubada em banho-maria 55°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

B. Análise da Quantificação da expressão de miRNA

Foi utilizada a técnica *GeneChip*® microRNA 4.0 *array* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) contendo sondas representando 2.588 miRNAs (miRBase versão 21; www.mirbase.org) para análise da quantificação da expressão de miRNA, de acordo com o protocolo do fabricante.

Resumidamente, as amostras de RNA obtidas foram rapidamente descongeladas e foram submetidas à incorporação da cauda poli-A na extremidade 3', seguida por uma segunda etapa de reação de ligação e biotilação da cauda 3'-

poli A do RNA. O RNA marcado com biotina foi hibridizado com o cartucho *GeneChip®* miRNA 4.0 array, para cada amostra, e detectado com o conjugado *Avidin-Estreptavidina-Ficoeritrina (PE)*, que se liga ao RNA marcado com biotina com forte afinidade. Cartuchos de matriz de miRNA foram então colocados em bandejas de forno de hibridização e as bandejas foram carregadas no forno de hibridização e incubadas a 48°C com rotação de 60rpm por 16 horas. Após a hibridização, cada *array* foi preenchido com tampão de retenção de *array* e deixado atingir a temperatura ambiente antes da lavagem e coloração. As etapas de lavagem e coloração foram realizadas usando o *script* de fluidos apropriado para matrizes de cartuchos na estação de fluidos. As matrizes foram digitalizadas e os dados exportados para análise posterior usando o software *Expression Console (Affymetrix)* para resumo de dados, normalização e controle de qualidade.

Os dados do *scaffold* endotelizado e *scaffold* endotelizado/músculo liso foram analisados independentemente para identificar miRNAs significativamente regulados (variação de dobra, $FC \geq 2$ e $p < 0,05$) em cada tipo de *scaffold* em comparação com seus tecidos normais correspondentes.

C. Análise de previsão de alvo de miRNA

Os miRNAs desregulados foram submetidos à análise de predição de alvo usando duas ferramentas bioinformáticas diferentes: microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), usando como critério para seleção de alvo, resultados com “muito alto” (top 1%) e pontuações “altas” (5% superiores) para probabilidade de interação. Além disso, incluímos interações validadas em miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)

4.13 Cálculo Amostral e Estatística

O tamanho da amostra foi calculado para um número (n) de 5 repetições por grupo, sendo levado em consideração um desvio padrão de 20%, para se detectar diferenças ao nível de 50% com nível de significância de 0,05, ponderando-se o poder do teste em 90%.

As análises estatísticas dos resultados serão realizadas após teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Os dados paramétricos foram avaliados com Teste *T-student* e os dados não paramétricos pelo teste de Mann-Whitney. Para avaliação de variáveis dicotômicas foi utilizado o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O nível de significância foi considerado de 5% e a análise foi realizada através de um software estatístico (IBM SPSS Statistics V22.0).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção e descelularização de veias cava inferiores

Foram obtidas 30 VCIs, que foram fragmentadas em aproximadamente 80 fragmentos de 1cm, que descelularizadas com SDS 1% em agitação contínua por 2 horas à 37°C (Shaker News Brunswick Scientific®). Os fragmentos foram acondicionados e conservados em geladeira à 4°C até o momento da utilização conforme descrito previamente.

5.1.1 Caracterização Histológica em hematoxilina e eosina (HE) dos scaffolds

Por meio de análise das fotomicrografias, pode-se concluir que o processo de descelularização foi eficaz, diante da observação da ausência do material celular e preservação da MEC, corroborando os dados já obtidos por essa equipe de estudo. (Figuras 2A, B e C)

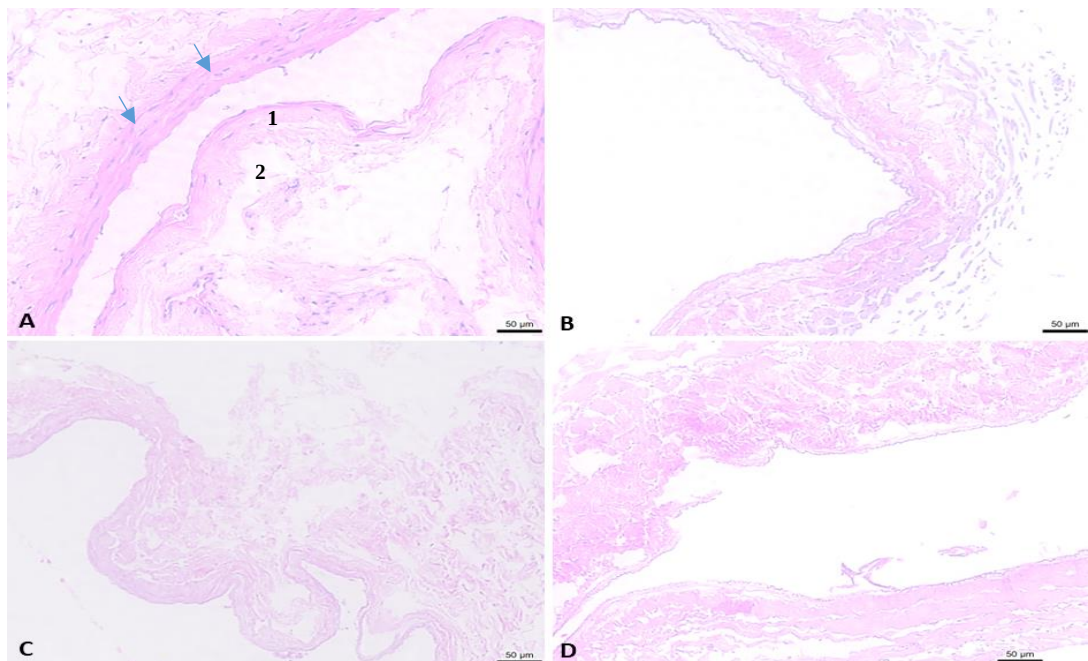


Figura 2. Fotomicrografia do corte histológico com coloração em HE do controle dos *scaffold*. **A:** Veia *in natura*, observarmos nas pontas das setas o núcleo celular, **1:** camada endotelial, **2:** camada adventícia; **B, C e D:** veia descelularizada com SDS, onde podemos observar a ausência de núcleos celulares e somente a matriz colágena da veia; **Autoria própria.**

5.2 Obtenção de tecido adiposo

As ASCs foram obtidas de 20 animais conforme apresentado previamente,

de forma padronizada e reprodutível, em número suficiente para a realização de todos os experimentos.

5.2.1 Expansão e viabilidade celular

A Tabela 2 representa o número de células obtidas, a viabilidade celular. A cultura celular em condições adequadas fornece nutrientes para que a recuperação das células ocorra de forma natural, sendo que foram obtidas aproximadamente 54 alíquotas de ASCs que foram utilizadas nos experimentos ou congeladas. As amostras de 1 a 10 foram congeladas em passagem celular 3 e as amostras 11 a 20 foram congeladas em passagem celular 2 em freezer -80°C até serem utilizadas nos experimentos.

Tabela 2. Contagem e Viabilidade celular das amostras 1 a 20 de cultura de Células Tronco Mesenquimais.

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
P	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml
1	100	1,9x10 ⁶	98	2,7x10 ⁶	100	1,7x10 ⁶	100	1,8x10 ⁶	100	2,1x10 ⁶
2	100	2,8x10 ⁷	100	2x10 ⁷	100	2,4x10 ⁷	100	2,9x10 ⁷	100	3x10 ⁷
3	99	1,9x10 ⁸	100	1,8x10 ⁸	100	1x10 ⁸	100	1,5x10 ⁸	100	1,8x10 ⁸
	Amostra 6		Amostra 7		Amostra 8		Amostra 9		Amostra 10	
P	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml
1	100	2x10 ⁶	100	2,7x10 ⁶	100	2,7x10 ⁶	100	9.1x10 ⁵	100	9x10 ⁵
2	100	3,1x10 ⁷	100	3,4x10 ⁷	100	3,9x10 ⁷	100	1,9x10 ⁶	100	1,8x10 ⁶
3	100	2x10 ⁸	100	2.8x10 ⁸	100	1,8x10 ⁸	100	1,8x10 ⁷	100	2,7x10 ⁷
	Amostra 11		Amostra 12		Amostra 13		Amostra 14		Amostra 15	
P	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml
1	100	1.4x10 ⁶	100	2,0x10 ⁶	100	1,9x10 ⁶	100	1,5x10 ⁶	100	2x10 ⁶
2	98	2,1x10 ⁷	100	2,6x10 ⁷	100	3x10 ⁷	99	2,6x10 ⁷	100	2,8x10 ⁷
	Amostra 16		Amostra 17		Amostra 18		Amostra 19		Amostra 20	
P	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml	V%	cel/ml
1	100	2.8x10 ⁶	100	2,3x10 ⁶	100	2,1x10 ⁶	100	2,4x10 ⁶	100	1.8x10 ⁶
2	100	3x10 ⁷	100	2,9x10 ⁷	100	2,9x10 ⁷	100	3x10 ⁷	100	2,9x10 ⁷

P= passagem celular; V= viabilidade; cel= células viáveis.

5.2.2 Teste de controle de qualidade das ASC

A. Controle por microscopia invertida de células em cultura

Após a constituição do banco de ASC foram iniciadas as técnicas de caracterização das ASC segundo os critérios da ISCT.⁸² Na Figura 3 pode-se observar o aspecto de aderência das ASC com sua morfologia clássica, em monocamada e com aspecto fibroblastóide, em microscopia invertida das garrafas de cultura. Em B, após 15 dias de cultura, observa-se uma confluência elevada, aproximadamente de 100%, pela mesma técnica. Os pontos mais claros são as células senescentes que se despregaram da placa por serem células não aderentes normais e possuírem um mecanismo natural de inibição por contato.

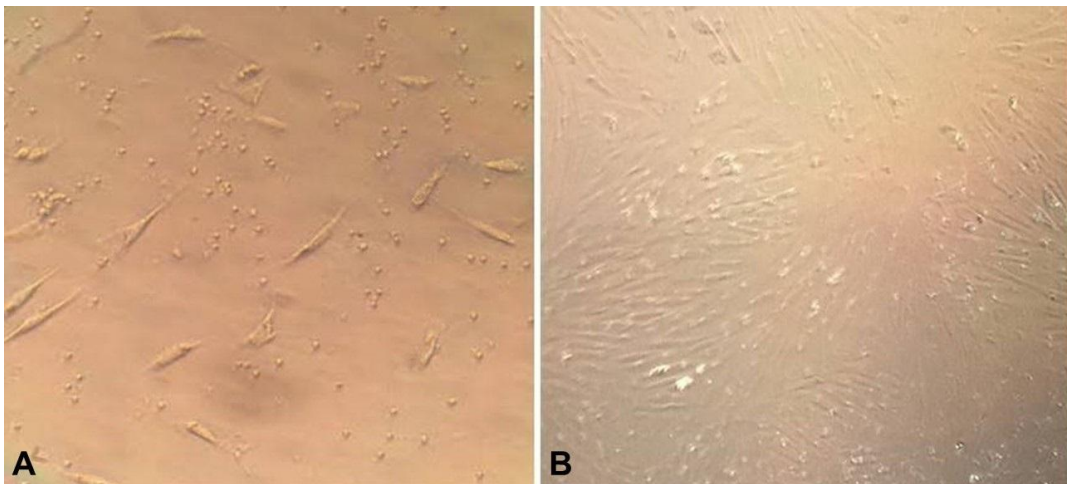


Figura 3. Fotomicrografia de cultura de ASC por microscopia invertida, contraste de fase em **A**: 3 dias; **B**: 15 dias. 40x; **Autoria própria.**

B. Diferenciação em Tri-linhagem

A diferenciação das ASCs em tri-linhagem comprova o perfil multipotente da célula-tronco, ainda atendendo os padrões de qualidade da ISCT, todas em análise em microscopia invertida por contraste de fases. Foram realizadas as diferenciações em osso, cartilagem e tecido adiposo, conforme apresentado previamente. Na Figura 4, pode-se observar em **A**, por microscopia invertida contraste de fase, as células-tronco mesenquimais não diferenciadas. Observam-se ainda detalhes dos adipócitos após a diferenciação de ASC com meio indutor específico em **B** e em **C** e o aspecto dos adipócitos após a coloração com Oil Red®

em garrafas de cultura (gotículas de lipídeos em pontos avermelhados).

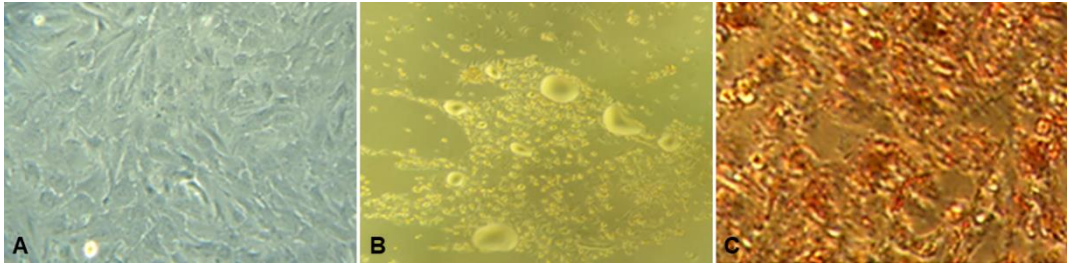


Figura 4. Fotomicrografia por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em tecido adiposo. **A:** ASC não diferenciada e não corada; **B:** ASC diferenciada em tecido adiposo, não corada; **C:** Diferenciação adipogênica corada com Oil Red [®]. **Autoria própria.**

Na Figura 5 observa-se a sequência de diferenciação osteogênica em microscopia invertida de contraste de fase. Em **A**, observe-se o controle de ASCs não diferenciadas. Em **B** observe-se as células diferenciadas sem a adição do corante, após 14 dias de indução, em **C** observe-se a coloração por Alizarin Red[®] (evidenciando em vermelho os locais com grande confluência de depósito de cálcio, evidenciando desta forma as trabéculas ósseas).

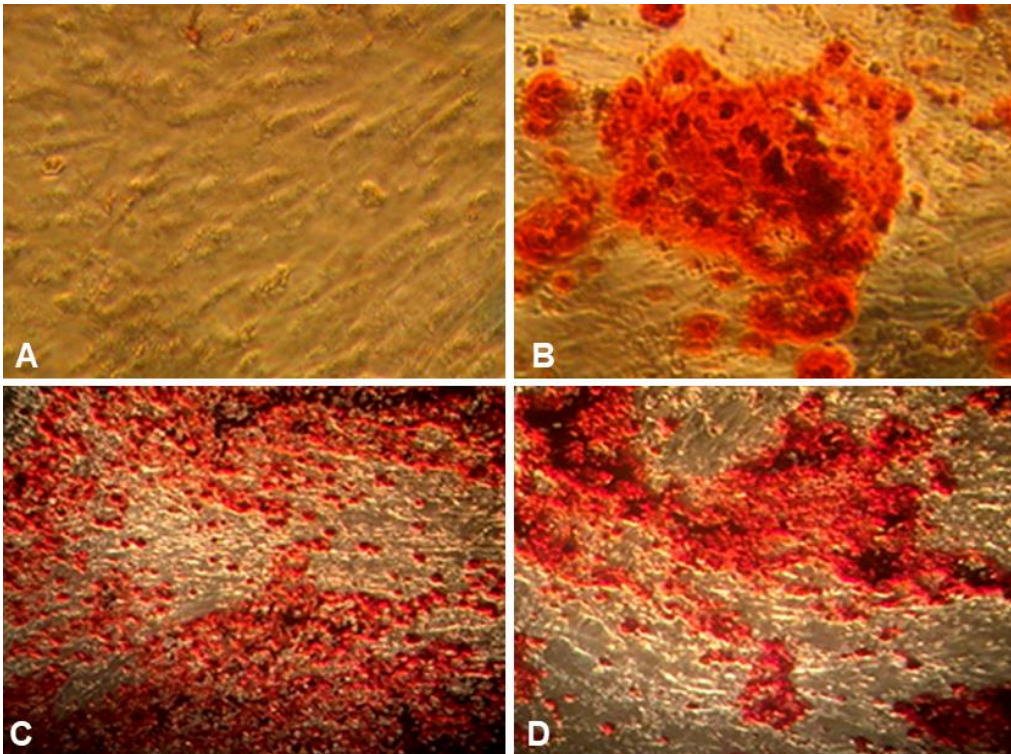


Figura 5. Fotomicrografias por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em Células ósseas. **A:** controle negativo (célula não diferenciada); **B:** Diferenciação óssea, aumento 40x EM TRABÉCULA; **C:** Diferenciação óssea aumento 20x; **D:** aumento de 10x. Todas as amostras foram coradas com Alizarin Red[®]. **Autoria própria.**

Na Figura 6 observa-se a comprovação da diferenciação das ASCs em células condrogênicas por microscopia invertida de contraste de fase. A coloração com Azul de Toluidina é apresentado em **A** e **B** após 14 dias de cultura (marcando os condrócitos e núcleos isogênicos)

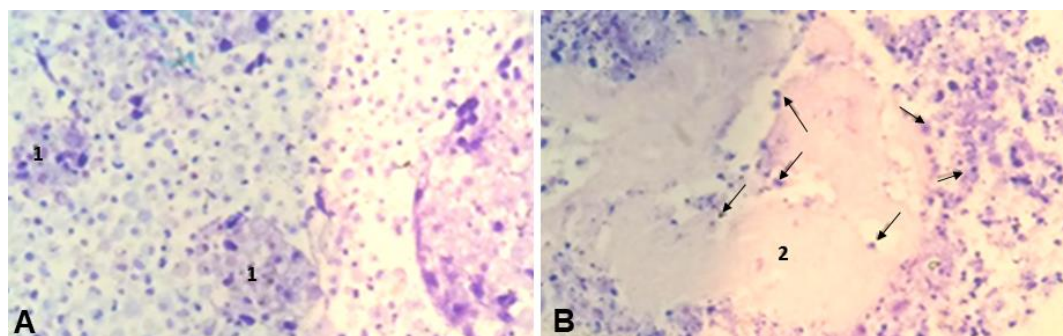
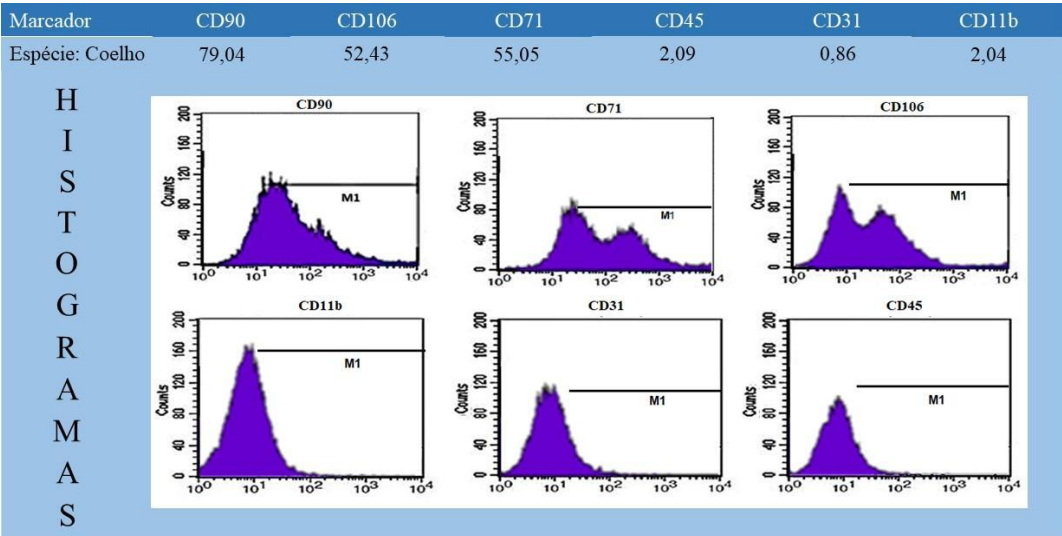


Figura 6. Fotomicrografia por microscopia da diferenciação condrogênica de ASC corada com Azul de Toluidina. **A:** diferenciação condrogênica, aumento 20x; 1= núcleo isogênico **B:** Aumento 20x, nas pontas das setas correspondem aos condrócitos e núcleos isogênicos com exuberância de matriz extracelular (matriz óssea) 2= condrócitos secretores. **Autoria própria.**

C. Imunofenotipagem por expressão de marcadores de superfície celular (CD)

Os valores médios de intensidade de fluorescência para os três CDs (90, 106 e 71) comerciais foram de 79,04%, 52,43% e 55,05% respectivamente. Estes valores estão abaixo do encontrado para as ASC testadas com anticorpos específicos para a espécie, mesmo assim, dentro do padrão de positividade estabelecido pela ISCT, que sugere valores acima de 50% (Figura 7). Destaca-se que, na representação em histogramas, da distribuição das células avaliadas por citometria (em média, 20.000 células/análise), foi identificado uma tendência de dois picos de fluorescência correspondendo a tamanho e granulosidade diferentes, nos três marcadores positivos, com maior expressividade para o CD106 e CD71. Isto pode ser justificado pelo uso de anticorpos não espécie-específicos. Porém, os achados também podem ser corroborados pelo conhecimento prévio de que em uma mesma cultura de ASC podemos encontrar células em diferentes níveis de diferenciação coexistindo em um mesmo ambiente de cultura, mas não subtipos celulares diferentes. Ainda, as células mais imaturas apresentam maior tamanho e menor granulosidade que as células mais maduras, o que corresponde ao segundo pico

encontrado na distribuição do histograma por citometria de fluxo.



Obs: os anticorpos utilizados foram de rato com reação cruzada com coelho diante da indisponibilidade de reagentes específicos no mercado.

Figura 7. Perfil fenotípico das ASC, com marcadores CD90/45, CD106/11B e CD 71/31 pela técnica de citometria de fluxo. **Autoria própria.**

5.3 Experimentos de diferenciação celular

5.3.1 Adesão celular ao scaffold 3D.

De acordo com a metodologia, cada grupo foi constituído de 5 amostras (n=5) de 1cm de VCIdesc, em cultura com DMEM + 10% SFB, após 21 dias foi realizado a confecção de lâminas em HE e IF, cada grupo teve três lâminas com 10 fragmentos cada, coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram fotografadas em microscopia de campo claro (microscópio LEICA) e então foi realizada a contagem aleatória de 10 campos de células, por fragmento, para se identificar o número de células presentes. Os dados foram computados em uma planilha Excel e estão sendo analisados estatisticamente. (Figuras 8, 9)

Utilizando os dados obtidos, foi ajustado um modelo de Poisson, seguido do teste de comparação múltipla de Wald, foi encontrada diferença significativa para o modelo que recebeu 1×10^6 ASC ($p < 0,01$). O protocolo elencado foi de veias descelularizadas com 1% SDS por 2 horas em Shaker com 1×10^6 .

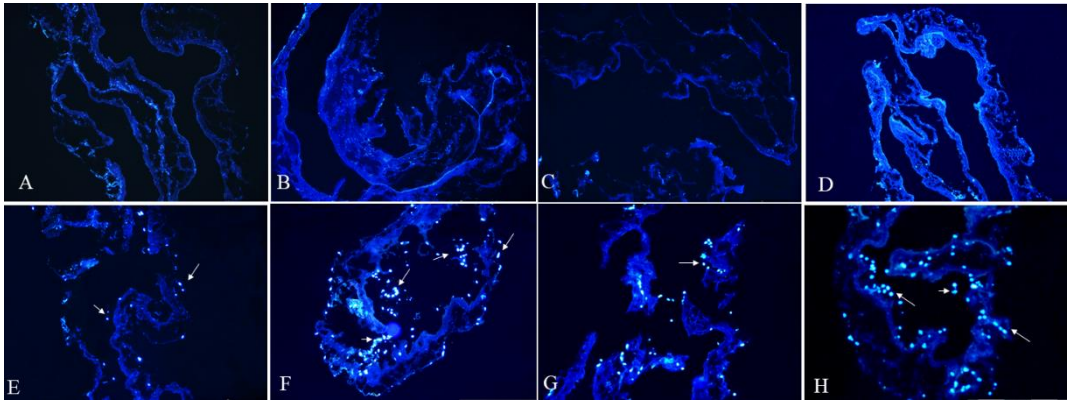


Figura 8. Fotomicrografia das lâminas de Imunofluorescência, com marcação de Dapi. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. **Autoria própria.**

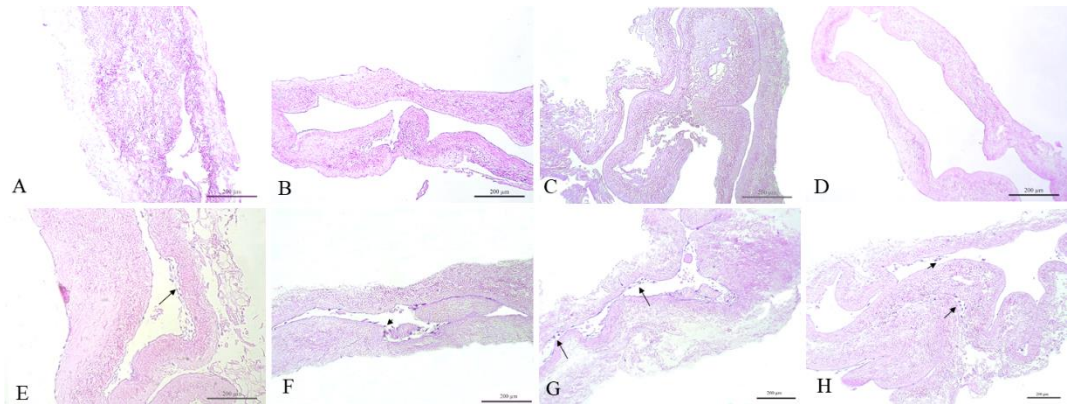


Figura 9. Fotomicrografia das lâminas em HE. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. **Autoria própria.**

5.3.2 Endotelização do scaffold de veia cava inferior

O experimento foi dividido em dois grupos, em três tempos diferentes: 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas:

- Grupo controle: 5 fragmentos por tempo (total 15 fragmentos de veias cavas descelularizadas). Meio de cultura M199;
- Grupo experimento: 5 fragmentos por tempo (total 15 fragmentos de veias cavas descelularizadas). Meio de cultura M199 foi suplementado com fatores de diferenciação endotelial comerciais na proporção de: 10ng/mL VEGF, 50ng/mL β FGF, 20ng/mL e 10% de SFB.

De acordo com a metodologia, os *scaffolds* receberam em sua luz interna uma solução de 5µL de Puramatrix® preparada com 1×10^5 ASC.

A comprovação da gelificação foi de forma visual, o produto foi transportado para poços de placa de cultura de 24 poços não aderente, onde estes foram completados com 3 ml de meio de cultura. As placas de cultura foram mantidas em ambiente umidificado de forma controlada, à 37°C, 5% de CO₂, com troca de meio de dois em dois dias. Após o encerramento do experimento, os materiais foram seccionados e analisados conforme metodologia

As análises realizadas nas fotomicrografias em HE demonstraram que a resposta de recelularização endotelial ocorreu de forma mais homogênea nas culturas de 4 e 8 semanas com povoamento celular mais significativo. O grupo com 2 semanas de cultura não demonstrou um crescimento expressivo de células agregadas na luz do *scaffold*. O grupo com 8 semanas de cultura apresentou crescimento de células endoteliais, porém não conseguimos identificar melhoria significativa em comparação ao grupo de 4 semanas, sendo que em 4 semanas elas ficaram mais homogêneas na face luminal. (Figura 10)

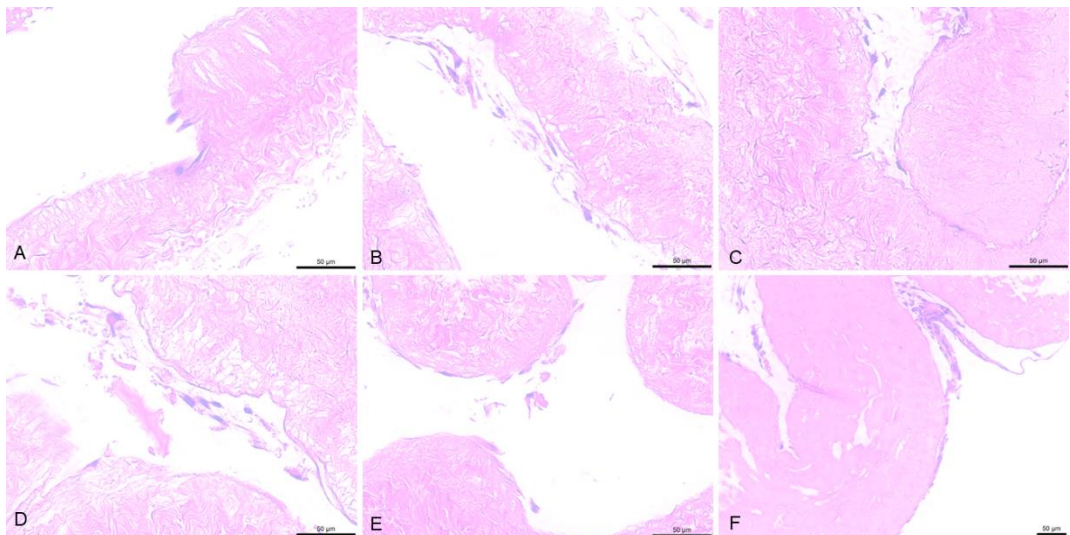


Figura 10. Fotomicrografia das lâminas dos *scaffold* s descelularizados com SDS e recelularizado com 1×10^6 celularizado. Grupo Controle -**A:** 2 semanas; **B:** 4 semanas; **C:** 8 semanas; Grupo Experimento -**D:** 2 semanas; **E:** 4 semanas; **F:** 8 semanas; **Autoria própria.**

Nas análises por IHQ, as fotomicrografias demonstraram-se positivas e com

melhores resultados visuais para os anticorpos anti-CD 31 e anti-CD 146 (outros anticorpos foram testados e descartados) nas lâminas do grupo experimento onde realizamos a recelularização do endotélio do *scaffold* através de meio de cultura com fatores de crescimento endotelial em comparação ao grupo controle que não apresentou marcação significativa. (Figura 11)

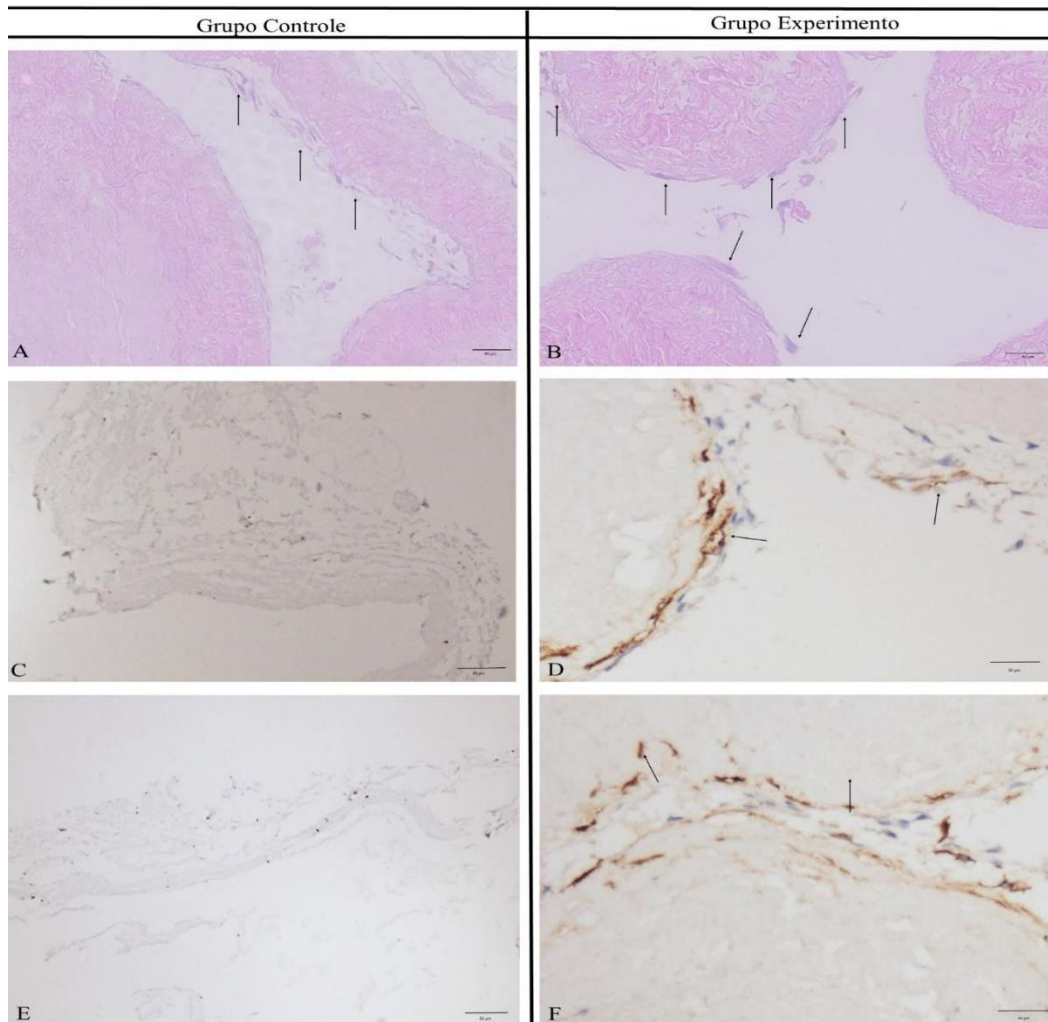


Figura 11. Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 1. **Grupo Controle:** **A** - nas setas indicam a repovoação celular da luz do *scaffold*, **C** e **E** – fotomicrografias de IHQ negativas para marcação de CD31 e CD146, respectivamente; **Grupo Experimento:** **B** - nas setas indicam a repovoação celular linear da luz do *scaffold*, **D** e **F**- fotomicrografias de IHQ positiva para marcação de CD31 e CD146, respectivamente. **Autoria própria.**

As análises em IF mostraram excelente resultado do povoamento celular na face luminal do *scaffold* tanto para grupo experimento como para o controle, porém

o grupo experimento demonstrou uma linearidade e homogeneidade no crescimento e diferenciação endotelial na camada luminal do *scaffold* para o grupo tratado em comparação com o grupo controle. Frente aos achados, considerou-se que o melhor resultado foi para o tempo de 4 semanas. (Figura 12)

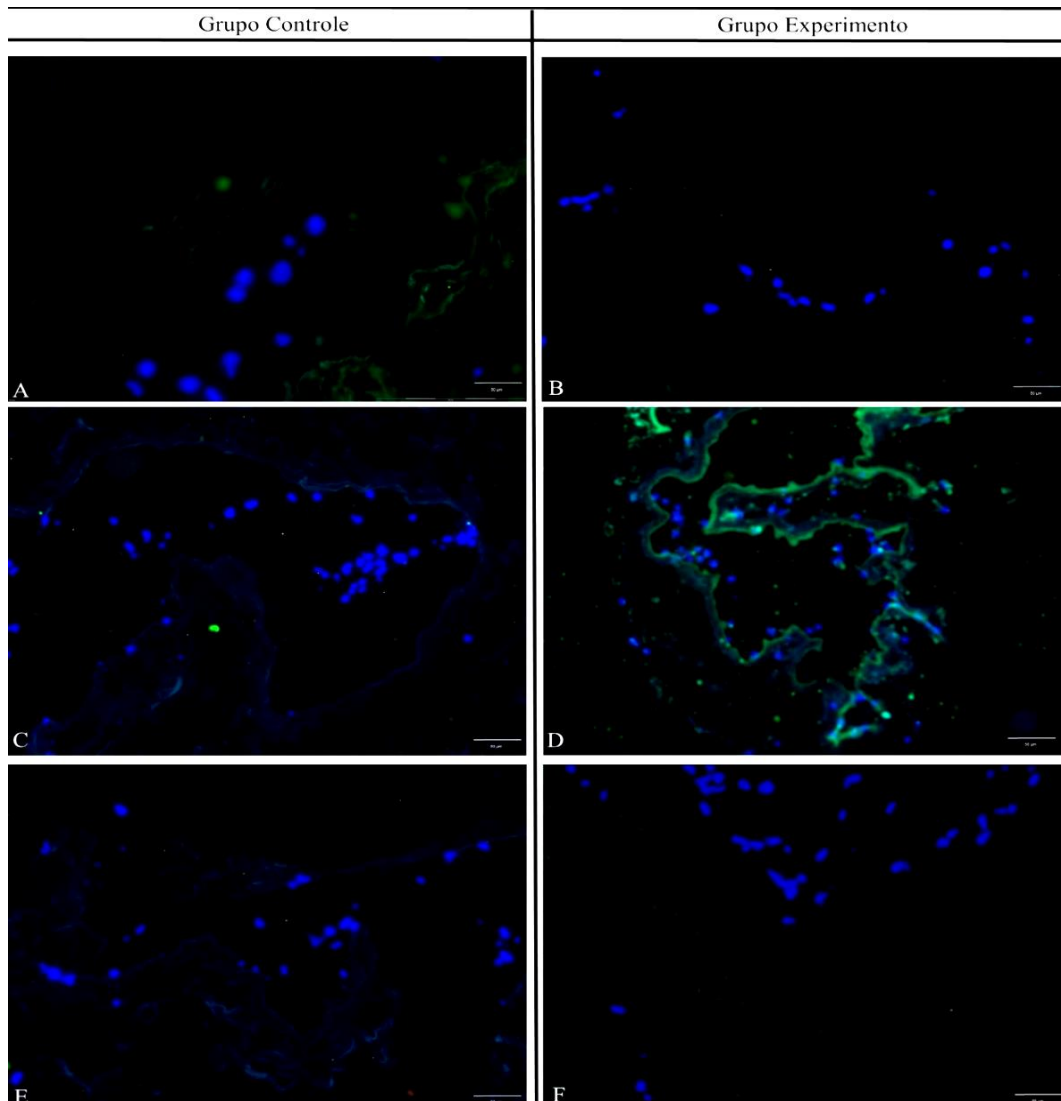


Figura 12. Painele das fotomicrografias em imunofluorescência do experimento 1, com marcação de CD146 para o endotélio (FITC) e DAPI para os núcleos celulares, **Grupo Controle:** A: 2 semanas C: 4 semanas e E: 8 semanas; **Grupo Experimento:** B: 2 semanas, D: 4 semanas e F: 8 semanas **Autoria própria.**

Realizamos a análise das lâminas de fluorescência em microscópio confocal para melhorar os parâmetros visuais e comprovação do fenótipo das marcações específicas endoteliais (DAPI = azul = núcleo; FITC = verde = parede

celular CD31 e CD146; e Qtracker = vermelho/alaranjado = marcação do citoplasma das ASC antes dos experimentos em cultura). (Figuras 13 e 14)

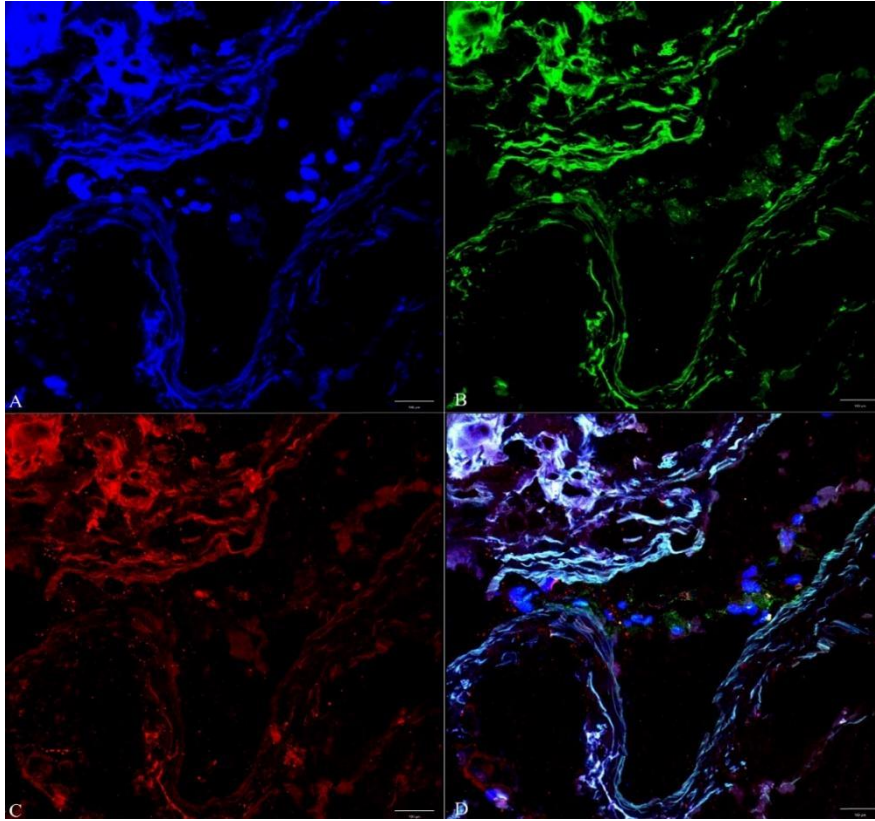


Figura 13. Imagem realizada em microscópio confocal de fluorescência de lâmina de endotelização em tempo de cultura de 4 semanas. **A:** Marcação com DAPI = azul = núcleos celulares; **B:** Marcação com FITC = verde = parede celular anti-CD31; **C:** Marcação com Qtracker = vermelho alaranjado = marcação citoplasmática de rastreo das ASC cultivadas; **D:** Imagem confocal das 3 marcações, onde podemos uma população alinhada de células endoteliais. Aumento 200x. **Autoria própria.**

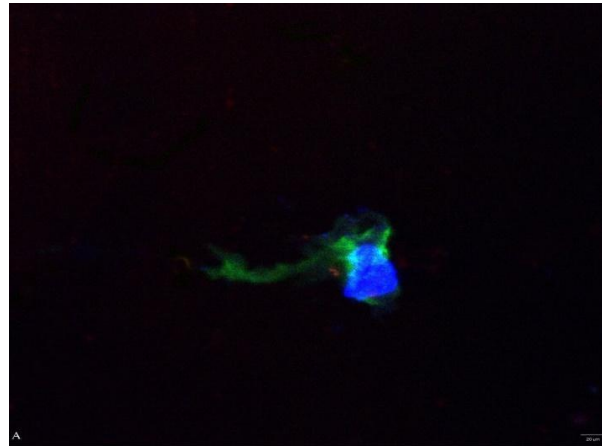


Figura 14. Célula endotelial, originada a partir de recelularização de *scaffold* (descelularizado com SDS) em cultura por 4 semanas. Imagem obtida em microscópio confocal de fluorescência (DAPI = azul = núcleos celulares; FITC = verde = parede celular anti-CD31; marcação com Qtracker = vermelho/alaranjado = marcação citoplasmática de rastreio das ASC cultivadas). Aumento 400X. **Autoria própria.**

5.3.3 Diferenciação celular em músculo liso

De acordo com a metodologia, realizamos a diferenciação celular das ASCs em células musculares lisas (CML) durante 2 e 3 semanas, em meio de cultura M199 suplementado com 5% SFB com 2,5ng/mL de BMP4 recombinante humano e 5ng/mL de TGF-1. Realizamos a confirmação fenotípica das células musculares lisas antes do uso e após 2 e 3 semanas de cultura em frasco de cultura 175cm², onde contabilizamos 1,8x10⁸ células por *pellet* que foram emblocados e analisados em HE e por imunohistoquímica. O *pellet* destacado foi agrupado de forma simples por centrifugação (formando esferoides simples) e apresentaram resultado positivo para anti- α actina 1a4 e HHF35, de forma mais marcante no grupo que ficou em cultura por 3 semanas, sendo negativo para o grupo que não foi induzido. (Figura 15) A partir desse experimento, foi escolhido o tempo de 3 semanas para indução de diferenciação em CML.

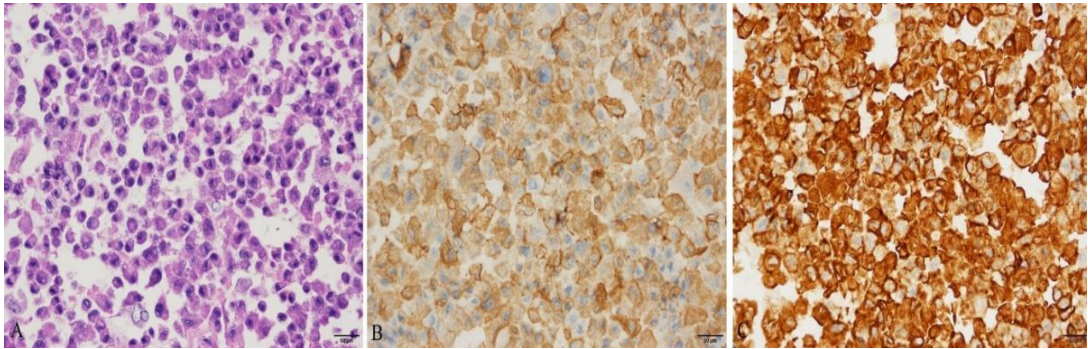


Figura 15. Caracterização da cultura de células musculares lisas. **A:** Fotomicrografia de células musculares lisas em HE; **B:** Fotomicrografia de células musculares lisas em IHQ com coloração positiva em anti-actina α 1a4; **C:** Fotomicrografia de células musculares lisas em IHQ com coloração positiva em HHF35. **Autoria própria.**

5.3.4 Semeadura do musculo liso no scaffold endotelizado

Com base no experimento anterior, onde observamos que o melhor tempo a ser utilizado foi de 4 semanas para o repovoamento endotelial do *scaffold*, procedemos conforme planejado. Sincronicamente, encerrada a terceira semana de cultura indutora para músculo liso e 4 semanas para endotelização dos *scaffolds*, foram semeadas 1×10^6 de CML diluídas em $10 \mu\text{L}$ de Puramatrix™ na fase externa do *scaffold* e mantidos em cultura síncrona, conforme descrito anteriormente, por 2 semanas e 4 semanas para escolha do melhor protocolo completo.

Após o término dos tempos de cultura dos experimentos, os neovasos completos foram seccionados e metade foi emblocada em parafina para realização de lâminas de HE e imunohistoquímica e a outra metade foi cortada por congelamento para análise em imunofluorescência. Como resultados, as análises em HE demonstraram um repovoamento das células epiteliais (CE) na luz do *scaffold* e ao mesmo tempo o repovoamento celular na camada externa dele. Foram notadas, ainda, algumas células na matriz que permeavam a MEC do *scaffold*, mas em pequena quantidade em comparação com as duas superfícies (interna e externa). Por fim, observamos que o grupo previamente endotelizado que ficou em 4 semanas em cultivo com as células musculares apresentou maior colonização celular na parede externa (apenas de forma visual) do neovaso em comparação com o grupo que ficou apenas 2 semanas em cultivo, sendo este considerado o melhor grupo e do qual

sucedeu-se as análises de miRNA (Figura 16).

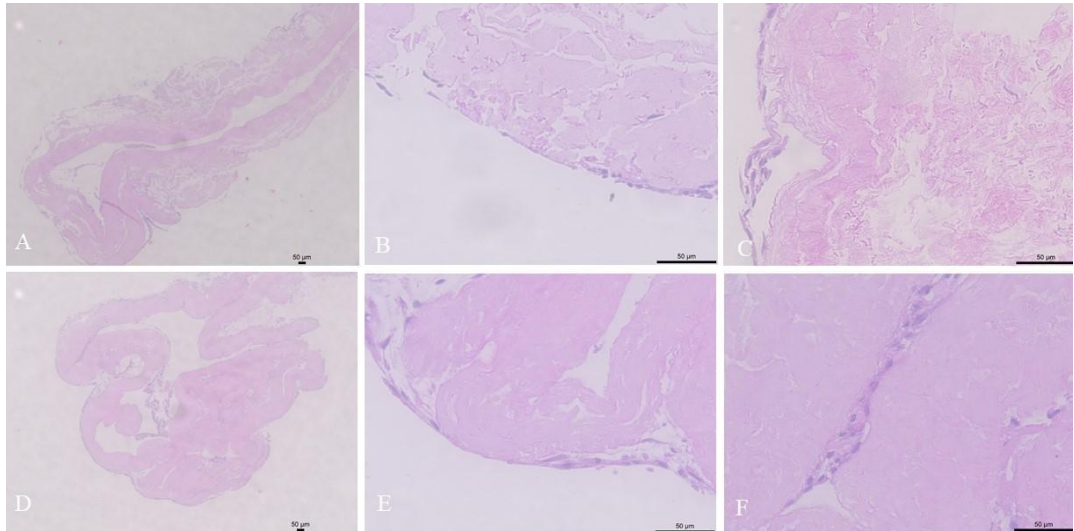


Figura 16. Fotomicrografia das lâminas do experimento 3 com *scaffold* celularizados na face interna e externa do vaso. Grupo Controle -**A:** 2 semanas 10X; **B:** 4 semanas; **C:** 2 semanas; Grupo Experimento -**D:** 2 semanas; **E:** 4 semanas; **F:** 2 semanas; **Autoria própria.**

As análises das fotomicrografias das lâminas de IHQ, demonstraram a marcações positivas para os anticorpos anti- α actina1a4 e HHF35 nas lâminas do grupo experimento onde realizamos a recelularização com CML conforme esperado.(Figura 17).

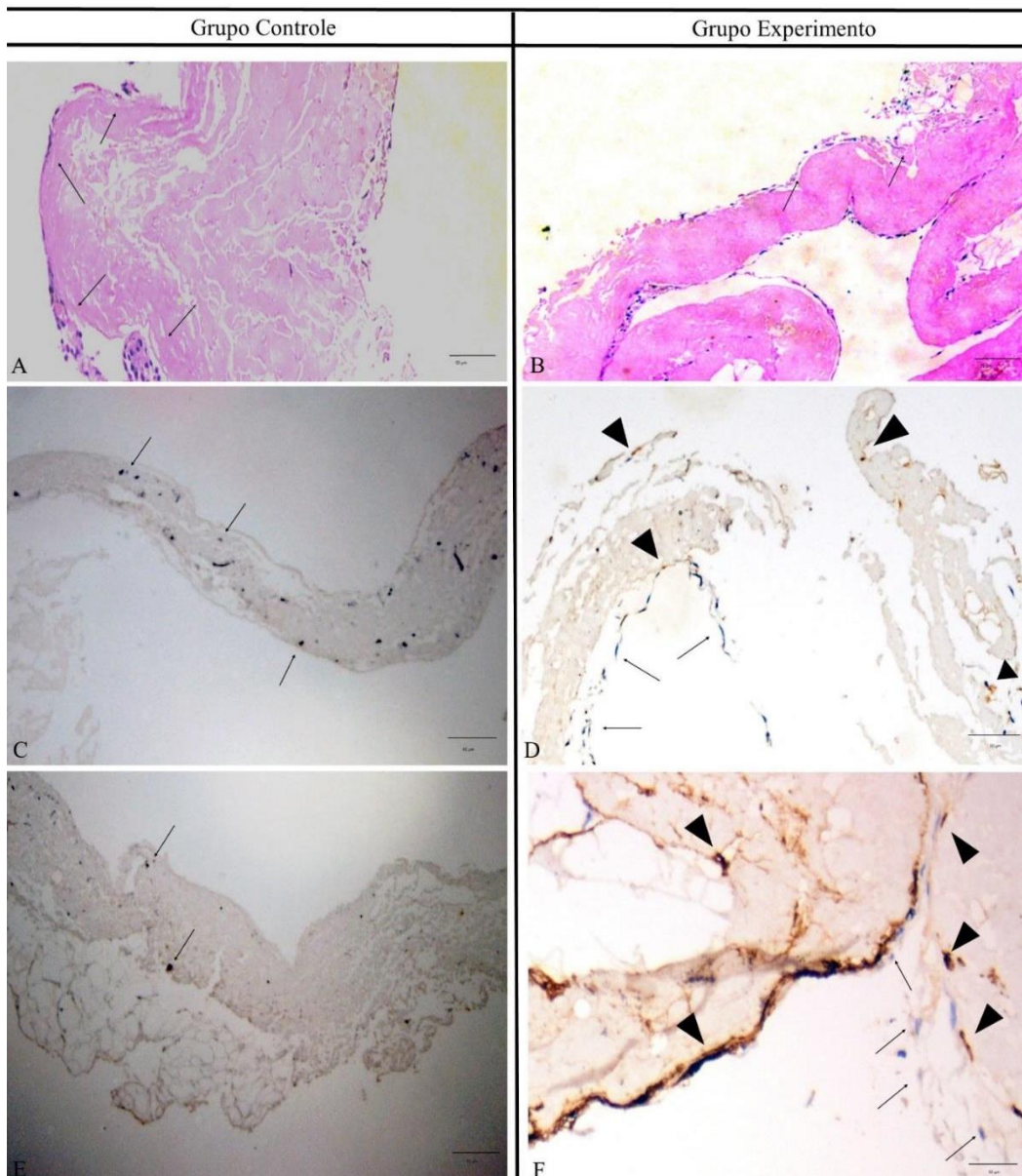


Figura 17. Paineis de análise das fotomicrográficas do experimento 1. **Grupo Controle:** A - nas setas indicam a repovoação celular da matriz externa do *scaffold* com células musculares lisas, C e E - fotomicrografias de IHQ negativas para marcação de anti-actina 1a4 e HHF35, respectivamente; **Grupo Experimento:** B - nas setas indicam a repovoação celular linear da matriz externa do *scaffold* com células musculares lisas, D e F - IHQ positiva para marcação de anti-actina 1a4 e HHF35, respectivamente. **Autoria própria.**

As análises através das fotomicrografias em IF demonstraram resultado da recelularização dos *scaffolds* tanto para grupo experimento como para o controle, porém o grupo experimento demonstrou uma linearidade e homogeneidade de crescimento, tanto para as células endoteliais (na camada interna) quanto para as

CML (na camada externa) do *scaffold* em comparação com o grupo controle. (Figura 18)

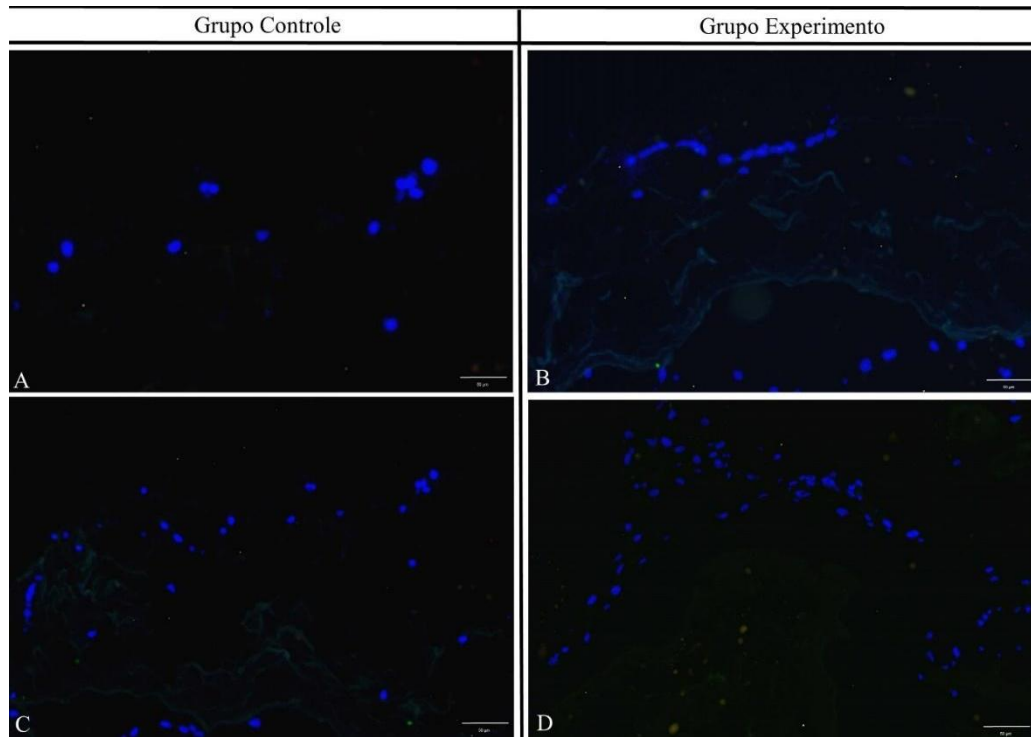


Figura 18. Painele de análise das fotomicrográficas do experimento 2 em imunofluorescência com marcação de com DAPI para os núcleos celulares. **Grupo Controle:** A: 2 semanas C:4 semanas; **Grupo Experimento:** B: 2 semanas, D:4 semanas. **Autoria própria.**

Foi realizada IF em microscopia confocal para melhor comprovação dos fenótipos nas marcações específicas para cada tipo celular, com fluorocromos (DAPI - azul, FITC - verde e Qtracker –prémarcada durante a cultura em vermelho). (Figura 19 e 20)

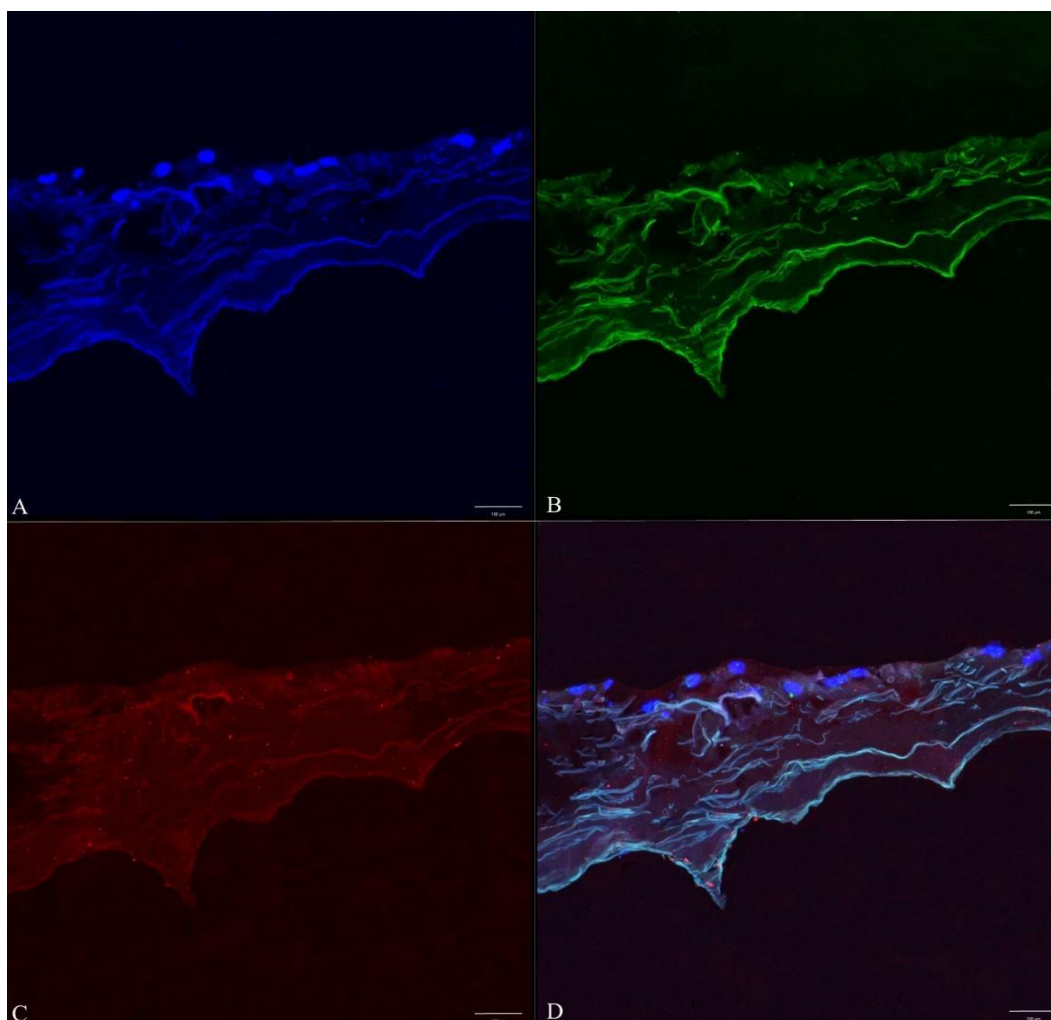


Figura 19. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia Confocal. **A:** DAPI = azul = núcleos celulares; **B:** FITC= verde = parede celular anti-CD146, **C:** marcação com Qtracker = vermelho/alaranjado = marcação citoplasmática de rastreio das ASC cultivadas; **D:** Junção das imagens evidenciando células na parede externa do *scaffold* (musculares lisas). **Autoria própria.**

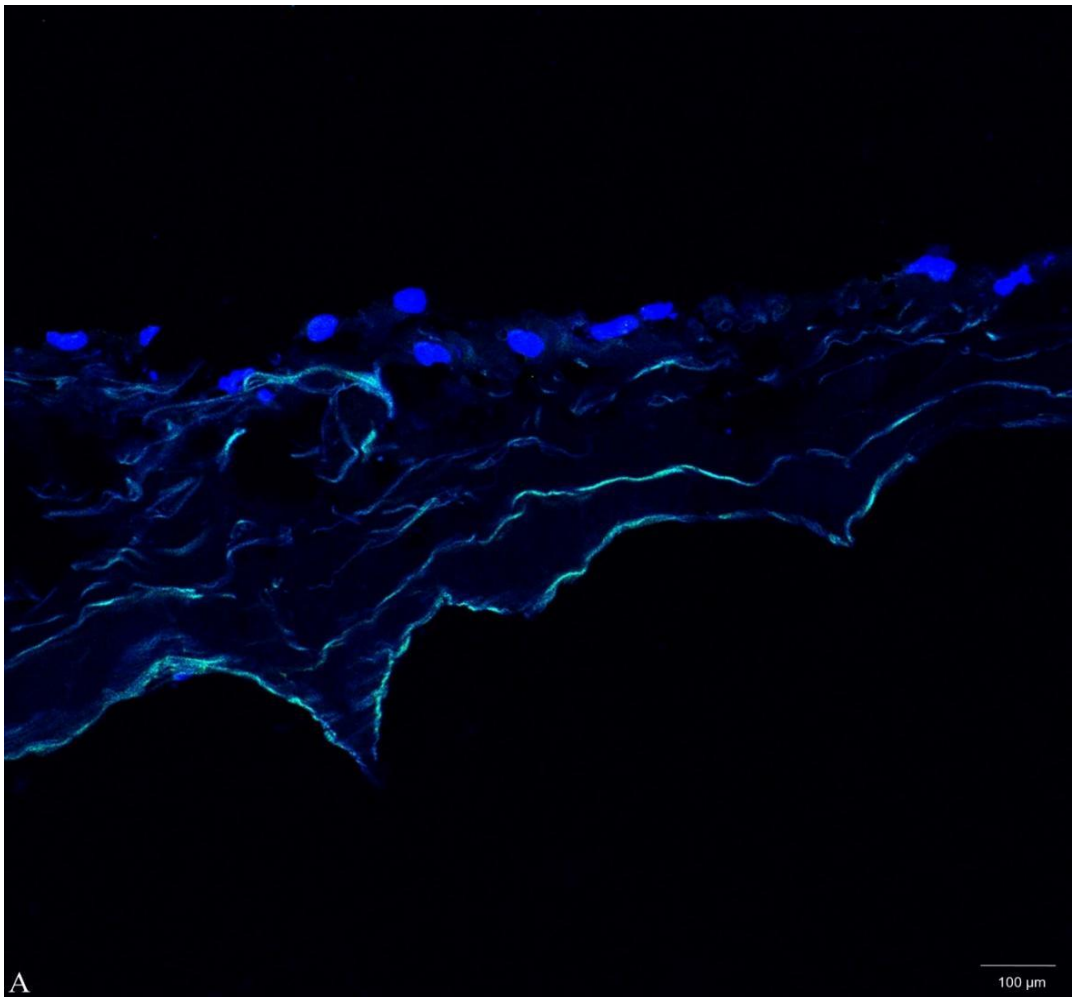


Figura 20. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia confocal de fluorescência, evidenciando apenas os núcleos celulares das células na parede externa do *scaffold* (DAPI = azul) e apenas uma célula endotelial na face luminal à esquerda marcada de verde (FITC = CD146). Aumento de 400x + zoom. **Autoria própria.**

5.4 Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante

Seguindo as técnicas descritas na metodologia, as amostras de sobrenadante de cultura que foram coletadas de 48 e 48 horas nas trocas de meio de cultura (*pools* de meio de cultura da 2ª semana e da 4ª semana), têm os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante

Grupo	Amostras	TNF alpha		IL10	
		2 semanas	4 Semanas	2 semanas	4 Semanas
Controle	A1	13.031	11.5	<0,000	<0,000
	B1	12.722	13.341	<0,000	<0,000
	C1	17.48	15.226	<0,000	0.945
	D1	12.722	15.865	<0,000	4.861
	E1	13.652	14.593	<0,000	<0,000
Experimento	F1	13.964	14.278	<0,000	<0,000
	G1	12.415	13.652	<0,000	<0,000
	H1	13.341	14.278	<0,000	<0,000
	I1	12.109	12.415	<0,000	<0,000
	J1	13.341	14.278	<0,000	7.96

Grupo	Amostra	IL6		PDGF	
		2 semanas	4 Semanas	2 semanas	4 Semanas
Controle	A1	<0,000	<0,000	0.039	<0,000
	B1	<0,000	<0,000	2.257	<0,000
	C1	<0,000	<0,000	<0,000	0.305
	D1	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000
	E1	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000
Experimento	F1	<0,000	<0,000	1.237	8.728
	G1	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000
	H1	<0,000	<0,000	1.57	2.257
	I1	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000
	J1	<0,000	<0,000	0.039	<0,000

A análise do perfil de interleucinas do sobrenadante do experimento 2, apresentou expressão para TNF α em todas as amostras, em algumas amostras em IL10 E PDGF; e nas amostras de IL6 a expressão foi insignificante em todas as amostras. Entretanto, não houve relevância estatística para esses achados ($p>0,05$).

5.5 Análise da expressão de miRNAs

A. Scaffold Endotelizado versus Controle (veia *in natura*)

Os resultados das análises de expressão global de miRNAs foram obtidos

utilizando a plataforma *GeneChip® arrays* (Affymetrix/ThermoFisher) conforme previamente descrito. Os resultados mostraram alterações na expressão de 605 miRNAs no *scaffold* endotelizado comparado com o controle (veia *in natura*). A seguir, selecionamos os miRNAs que possuíam os maiores valores de alteração (fold change, FC) para mais ou para menos, com valor de p significativo, aplicando um $FC \geq 2$, de forma que foram identificados 519 miRNAs alterados, sendo a maioria com expressão aumentada. A seguir, filtramos os resultados para identificar os miRNAs estatisticamente significativos, após correção de Bonferroni, resultando em 185 miRNAs com $p \leq 0,00002$.

De forma arbitrária, selecionamos 20 miRNAs mais significativos, sendo os top 10 com expressão aumentada e top 10 com expressão diminuída, de acordo com FC e valor de p corrigido (Tabela 4). Estes 20 miRNAs foram utilizados para predição de genes-alvo no banco de dados microRNA Data Integration Portal (miRDIP). Foram identificados 3.292 genes-alvo para os miRNAs. Em seguida, procurou-se identificar os genes que eram regulados por mais de um miRNA (optou-se por pelo menos 5 miRNAs), dentre os 20 miRNAs pesquisados. Essa estratégia permitiu identificar os genes e vias moleculares que apresentam *crosstalk* e que pudessem ser biologicamente relevantes no contexto do estudo. Os resultados obtidos mostraram que 915 genes-alvo identificados utilizando estes critérios.

Tabela 4. Experimento 1: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio versus controle)

<i>Transcript ID(Array Design)</i>	<i>Fold Change</i>	<i>P-val</i>	<i>FDR P-val</i>
Negativos			
hsa-miR-3157-3p	-22.56	3.75E-07	1.35E-05
hsa-miR-548a-3p	-20.69	6.27E-07	2.13E-05
hsa-miR-5000-5p	-38.47	1.19E-06	3.64E-05
hsa-miR-6880*	-18.04	1.55E-06	4.59E-05
hsa-miR-6732-5p*	-10.52	3.59E-06	9.55E-05
hsa-miR-8075*	-18.44	4.25E-06	0.0001
hsa-miR-455-3p	-8.08	7.36E-06	0.0002
hsa-miR-6808-3p*	-19.87	8.86E-06	0.0002
hsa-miR-3613-3p	-51.93	6.98E-06	0.0002
hsa-miR-4668-5p	-56.88	6.58E-06	0.0002

Positivos			
hsa-miR-145-5p	11136,11	6,37E-13	4,23E-09
hsa-miR-26a-5p	6540,45	2,72E-09	3,38E-07
hsa-miR-143-3p	5428,29	4,94E-09	4,89E-07
hsa-let-7c-5p	3311,85	3,06E-10	1,20E-07
hsa-let-7a-5p	3039,95	9,65E-09	7,90E-07
hsa-miR-149-3p	1858,19	2,43E-11	8,06E-08
hsa-let-7i-5p	1148,94	1,18E-10	1,02E-07
hsa-miR-27b-3p	1134,54	1,86E-09	2,46E-07
hsa-miR-191-5p	1096,44	6,79E-10	1,69E-07
Bonferroni correction (0,05 divided by 2.578 mature miRNAs included in the array) = p value for significance = 0,00002.			
*miRNAs in bold were not found in the prediction databases (therefore, there are no gene targets identified for these miRNAs).			

A seguir, os 915 genes-alvo foram utilizados para pesquisa no banco de dados EnrichR. A ferramenta EnrichR mostra resultados integrados de vários bancos de dados e com diferentes níveis de interpretação, incluindo Vias Moleculares (*pathways*), Ontologias (anotações de função biológica), entre outras. Os resultados das Vias Moleculares e Ontologias estão mostrados na Tabela Suplementar 1-3 (em anexos). Os resultados biológicos mais relevantes incluíram a via MAPK, identificada em 5 das 6 principais bases de dados (*Jesen Tissue, GO Biological Process 2021, GO Molecular functional, Kegg 2021 Human, WikiPathway 2021 human*). A via MAPK / ERK (também conhecida como via Ras-Raf-MEK-ERK) é uma via de sinalização a partir do estímulo de um receptor de membrana celular até a ativação da transcrição de genes específicos no núcleo da célula. O sinal começa quando uma molécula sinalizadora, como, por exemplo, um fator de crescimento, se liga ao seu receptor na superfície celular e termina com a transcrição nuclear promovendo alguma mudança na célula, como, por exemplo, a divisão celular.

Foi possível interpretar que o neovaso é uma estrutura ainda imatura e em formação, uma vez que apresenta vias moleculares de mitose bastante ativas. Outra via encontrada em 2 das 6 bases de dados foi a via de sinalização do TGF β , que atua

em mecanismos diversificados tanto na embriogênese como em indivíduos adultos, incluindo a regulação da MEC nas células mesodermas. A base de dados *Jensen Tissue*, apresenta vias regulatórias da angiopoietina, a qual pertence à família de fatores de crescimento vascular, importantes para a angiogênese embrionária e pós-natal. A sinalização da angiopoietina corresponde mais diretamente à angiogênese, o processo pelo qual novas artérias e veias se formam a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Vias de sinalização de pluripotência foram identificadas em 3 das 6 principais bases de dados (*Jensen Tissue*, *GO Biological Process 2021*, *GO Molecular functional*), sendo mais comumente relacionados ao crescimento celular e mitose. Entre os genes, considerou-se que as funções envolvendo multiplicação e diferenciação celular foram as mais importantes no contexto do estudo.

Muitos dos miRNAs identificados com aumento de expressão apresentaram valores de FC muito altos (1000x). Resultados similares foram reportados na literatura, em situações em que a expressão de miRNAs é induzida por um determinado tratamento. Criqui *et al*¹² relataram uma alteração de mais de 60 mil vezes (FC) do miR-122 circulante, após tratamento do choque cardiogênico induzido em modelo animal (porco).

Na figura 20, observa-se uma rede de vias moleculares e seus respectivos genes, ao todo 9 vias moleculares, 131 genes alvo e 6 miRNAs, sendo elas *Vascular system* (regulação do desenvolvimento vascular); *Vasculature* (responsável pelo desenvolvimento vascular); *Vascular endothelial growth factor receptor signaling pathways* (via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular); *Vascular transport* (responsável pelo transporte vascular); *Venous blood vessel development* (desenvolvimento de vasos sanguíneos venosos); *Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration* (regulação positiva da migração de células endoteliais dos vasos sanguíneos); *Positive regulation of cell migration* (responsável pela ativação ou aumento da frequência, taxa ou extensão da migração celular), *Positive regulation of endothelial cell migration* (regulação positiva da migração de células endoteliais); *Positive regulation of endothelial cell proliferation* (regulação positiva da proliferação de células endoteliais). Sendo



B. Scaffold Endotelizado com músculo liso versus Controle (veia *in natura*)

A mesma estratégia de análise foi utilizada conforme previamente descrito para a análise do neovaso completo *versus* a veia *in natura*. Desta forma, utilizamos todos os 45 miRNAs que passaram o filtro da correção estatística de Bonferroni, sendo 40 miRNAs com expressão aumentada e 5 com expressão diminuída (Tabela 5).

Dentre os 45 miRNAs identificados, três miRNAs (miR-3135b, miR-378g e miR-4433b-3p) não foram encontrados nos bancos de dados (miRDIP), ou os alvos preditos para estes miRNAs não atingiram o requisito mínimo de score muito alto de predição. Os resultados da análise de predição de genes-alvo dos miRNAs (miRDIP) mostraram um total de 5.099 genes.

Tabela 5. Experimento 2: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio *versus* controle)

Transcript ID(Array Design)	Fold Change	P-val	FDR P-val
Negativo			
hsa-miR-210-3p	-17,29	2,81E-08	1,16E-05
hsa-miR-222-3p	-9,4	8,46E-08	2,09E-05
hsa-miR-221-3p	-10,33	9,28E-08	2,10E-05
hsa-miR-146a-5p	-35,55	1,89E-07	3,21E-05
hsa-miR-4433b-3p	-6,15	3,23E-07	4,99E-05
Positivos			
hsa-miR-126-3p	351,93	3,83E-10	1,27E-06
hsa-miR-145-5p	97,26	2,95E-10	1,27E-06
hsa-miR-497-5p	66,25	7,05E-10	1,33E-06
hsa-miR-133a-3p	48,98	8,03E-10	1,33E-06
hsa-miR-1	28,49	5,55E-09	6,13E-06
hsa-miR-379-5p	16,64	4,75E-09	6,13E-06
hsa-miR-127-3p	23,6	7,92E-09	7,51E-06
hsa-miR-140-5p	37,19	1,18E-08	9,80E-06
hsa-miR-378c	52,75	1,70E-08	1,11E-05
hsa-miR-133b	33,46	1,60E-08	1,11E-05
hsa-miR-422 ^a	32,52	1,84E-08	1,11E-05
hsa-miR-139-5p	71,15	2,59E-08	1,16E-05
hsa-miR-487b-3p	17,81	2,43E-08	1,16E-05
hsa-miR-30e-3p	14,26	2,29E-08	1,16E-05
hsa-miR-145-3p	7,67	2,71E-08	1,16E-05

hsa-miR-378f	36,84	3,88E-08	1,35E-05
hsa-miR-3135b	21,51	3,64E-08	1,35E-05
hsa-miR-204-3p	14,79	3,67E-08	1,35E-05
hsa-miR-196b-5p	8,14	4,53E-08	1,50E-05
hsa-miR-486-5p	29,78	4,77E-08	1,51E-05
hsa-miR-532-5p	17,48	6,01E-08	1,73E-05
hsa-miR-411-5p	6,69	6,28E-08	1,73E-05
hsa-miR-451 ^a	95,52	8,52E-08	2,09E-05
hsa-miR-204-5p	24,02	9,13E-08	2,10E-05
hsa-miR-30c-2-3p	9,75	9,49E-08	2,10E-05
hsa-miR-378d	18,63	1,10E-07	2,27E-05
hsa-miR-193b-3p	16,46	1,09E-07	2,27E-05
hsa-miR-143-5p	33,55	1,18E-07	2,29E-05
hsa-let-7i-5p	22,31	1,17E-07	2,29E-05
hsa-miR-378i	33,42	1,27E-07	2,40E-05
hsa-miR-378a-5p	9,99	1,61E-07	2,96E-05
hsa-miR-500a-5p	11,4	1,76E-07	3,15E-05
hsa-mir-139	7,82	1,82E-07	3,18E-05
hsa-miR-378g	10,85	2,28E-07	3,73E-05
hsa-miR-23c	5,9	2,30E-07	3,73E-05
hsa-miR-99a-5p	26,34	2,43E-07	3,84E-05
hsa-mir-500 ^a	4,93	3,86E-07	5,82E-05
hsa-miR-501-5p	10,71	4,75E-07	7,00E-05
hsa-miR-301a-3p	6,74	6,28E-07	9,05E-05
<i>All miRNAs in this list were used for prediction of targets and pathways analyses, to increase our chances of finding differences related to muscle cells.</i>			

O escore utilizado (muito alto) significa que uma probabilidade muito alta de cada miRNA pesquisado realmente deve regular o gene-alvo ou genes-alvo. Dentre os 5.099 genes-alvo identificados pelo miRDIP, selecionou-se os genes que são preditos a serem regulados por pelo menos 5 miRNAs da lista dos 42 miRNAs pesquisados. Esse filtro resultou em 1.336 genes regulados. A lista de 1.336 genes foi então utilizada para identificação de vias moleculares na base de busca EnrichR. Os resultados completos podem ser acessados no link do [portal EnrichR](#). Entre os resultados das vias moleculares foram identificadas a via do EGF/EGFR, contendo genes que participam dos processos de diferenciação celular do endoderma e mesoderma, além de serem responsáveis por desempenhar um papel chave na

diferenciação de fibroblastos dependentes de TGF- β 1 em miofibroblastos. Outra via molecular identificada foi a do receptor de proteína morfogenética ósseo tipo II ou BMPR2, que se liga a proteínas morfogenéticas ósseas, membros da superfamília de ligantes TGF β , que estão envolvidas na sinalização parácrina. As BMPs estão envolvidas em uma série de funções celulares, incluindo osteogênese, crescimento celular e diferenciação celular. Foi possível identificar ainda, na base de dados *WikiPathways 2019 Human*, as vias moleculares VEGFA/VEGFR2, responsável pela diferenciação e proliferação de vasos sanguíneos e a via *Pathways in Pathogenesis of Cardiovascular Disease*, que explica a doença aterosclerótica cardiovascular. Estes resultados sugerem um paralelo entre o processo regenerativo *versus* degenerativo, como uma tentativa insuficiente de regeneração arterial (Tabelas suplementares 4-6 em anexos).

Embora análises adicionais sejam importantes para validar os nossos resultados, os presentes achados nos remetem às vias moleculares da vasculogênese e angiogênese, as quais são extremamente relevantes nas doenças vasculares. Diante disso, selecionamos algumas vias para constituir uma rede com genes significativos para uma boa formação de um neovaso completo (Figura 22 e 23), sendo elas: *Vascular smooth muscle* (desenvolvimento de células musculares lisas associadas vasculares); *Vascular system* (regulação do desenvolvimento vascular); *Smooth Muscle* (proliferação de células musculares lisas); *vascular endothelial growth factor-activated receptor activity* (atividade do receptor do fator de crescimento endotelial vascular); *blood vessel morphogenesis* (morfogênese dos vasos sanguíneos); *BMP signaling pathway* (via de sinalização BMP); *cell morphogenesis involved in differentiation* (morfogênese celular envolvida na diferenciação); *endothelial cell Development* (desenvolvimento de células endoteliais); *mesenchymal cell differentiation* (diferenciação celular mesenquimal); *positive regulation of blood vessel endothelial cell Migration* (regulação positiva da migração de células endoteliais dos vasos sanguíneos); *positive regulation of vascular associated smooth muscle cell differentiation* (regulação positiva da diferenciação de células musculares lisas associadas aos vasos); *positive regulation*

of vascular associated smooth muscle cell proliferation (regulação positiva da proliferação de células musculares lisas associadas aos vasos); *positive regulation of vascular endothelial cell proliferation* (regulação positiva da proliferação de células endoteliais vasculares); *positive regulation of vasculogenesis* (regulação positiva da vasculogênese); *regulation of angiogenesis* (regulação da angiogênese); *vascular transport* (responsável pelo transporte vascular).

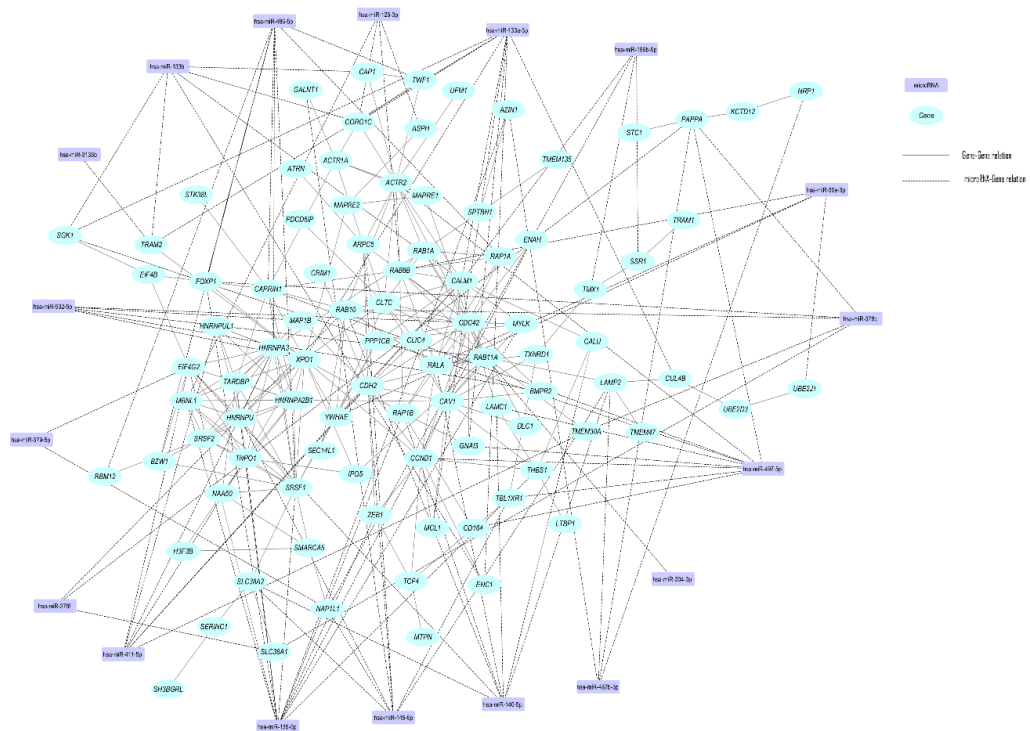


Figura 22. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso versus controle

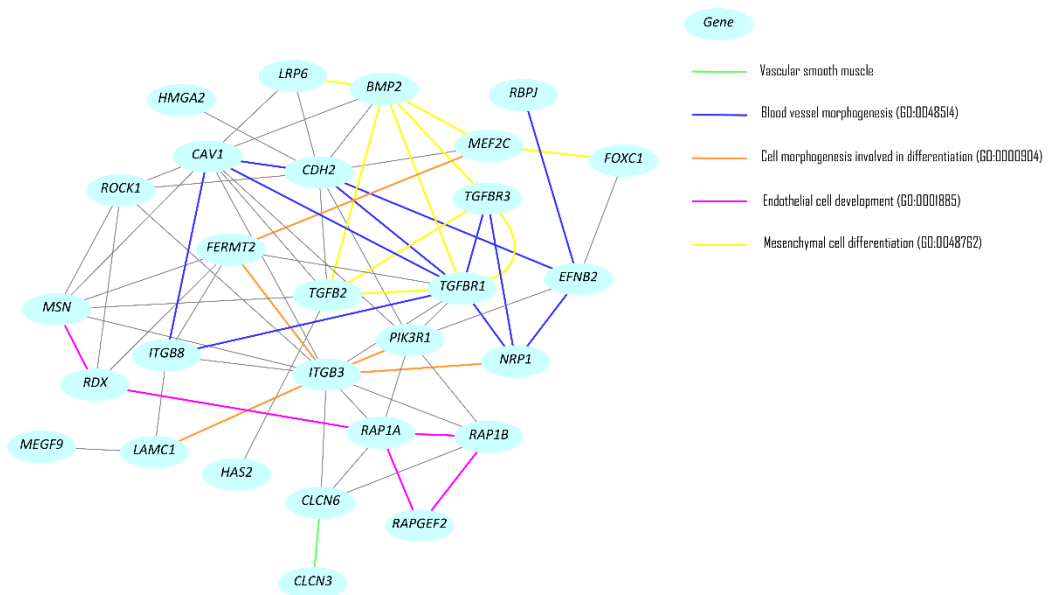


Figura 23. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso versus controle

5.5.1 Scaffold recelularizado com ASC diferenciadas versus Célula-tronco indiferenciada

A. Scaffolds endotelizado versus células indiferenciadas

Os resultados mostraram alterações na expressão de 15.100 miRNAs nas células endoteliais comparado com o controle (CTM indiferenciada). A seguir, selecionamos os miRNAs que possuíam os maiores valores de alteração (fold change, FC) para mais ou para menos, com valor de p significativo. Aplicando um $FC \geq 2$, foram identificados 277 miRNAs alterados, sendo a maioria com expressão aumentada no *scaffold* endotelizado comparado com o controle. A seguir, filtramos os resultados para identificar os miRNAs estatisticamente significativos, após correção de Bonferroni. Esta análise resultou em 83 miRNAs com $p \leq 0,00002$ (Tabela suplementar 7 em anexo). Estes miRNAs foram utilizados para predição de genes-alvo no banco de dados microRNA Data Integration Portal (miRDIP). Foram identificados 15.100 genes-alvo dos 83 miRNAs, sendo que procurou-se identificar os genes que são regulados por mais de um miRNA dentre os 83 miRNAs

pesquisados (Tabela 6). Foram selecionados genes regulados por pelo menos 5 miRNAs. Essa estratégia permitiu identificar os genes e vias moleculares que apresentam *crosstalk* e que podem ser biologicamente relevantes no contexto do estudo. Os resultados obtidos mostraram que 368 genes-alvo identificados utilizando estes critérios, apresentados na Figura 23.

Tabela 6. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos *Scaffold* endotelizado *versus* controle (ASC indiferenciadas).

Transcript ID(Array Design)	Fold Change	P-val	FDR P-val
hsa-miR-4281	196.88	1.08E-14	7.53E-11
hsa-miR-4433b-3p	302.98	1.15E-14	7.53E-11
hsa-miR-4463	220.35	1.68E-14	7.53E-11
hsa-miR-145-5p	462.1	3.12E-14	7.53E-11
hsa-miR-4651	107.7	8.81E-14	1.77E-10
hsa-miR-6803-5p	203.11	1.16E-13	2.21E-10
hsa-miR-6722-3p	98.59	3.51E-13	5.53E-10
hsa-miR-149-3p	370.76	5.51E-13	6.16E-10
hsa-let-7d-5p	465.96	7.14E-13	6.16E-10
hsa-miR-4649-5p	90.39	8.44E-13	6.53E-10
hsa-miR-222-3p	82.13	9.55E-13	6.53E-10
hsa-miR-3940-5p	204.43	1.03E-12	6.94E-10
hsa-miR-1227-5p	52.73	2.71E-12	1.31E-09
hsa-miR-4516	264.92	3.18E-12	1.39E-09
hsa-miR-6775-5p	62.22	3.46E-12	1.39E-09
hsa-miR-125a-5p	333.65	4.66E-12	1.56E-09
hsa-miR-6085	43.23	5.22E-12	1.64E-09
hsa-miR-6125	79.91	5.45E-12	1.69E-09
hsa-miR-4687-3p	124.33	6.77E-12	1.79E-09
hsa-let-7c-5p	1577.71	7.51E-12	1.79E-09
hsa-miR-4270	136.41	8.77E-12	1.79E-09
hsa-miR-92a-3p	121.97	8.83E-12	1.79E-09
hsa-miR-214-3p	308.01	9.91E-12	1.79E-09
hsa-miR-3135b	82.04	9.99E-12	1.79E-09
hsa-miR-199a-3p	508.17	1.00E-11	1.79E-09
hsa-miR-199b-3p	508.17	1.00E-11	1.79E-09
hsa-miR-1915-3p	27.82	1.09E-11	1.90E-09
hsa-miR-320a	214.16	1.25E-11	1.96E-09
hsa-miR-8089	41.9	1.37E-11	2.11E-09
hsa-miR-320c	154.25	1.84E-11	2.79E-09

hsa-miR-1207-5p	42.26	2.19E-11	3.26E-09
hsa-miR-328-5p	64.35	2.28E-11	3.26E-09
hsa-miR-191-5p	231.72	2.34E-11	3.26E-09
hsa-miR-4433-3p	118.9	2.34E-11	3.26E-09
hsa-miR-320d	68.02	2.54E-11	3.26E-09
hsa-miR-181a-5p	103.41	2.69E-11	3.26E-09
hsa-miR-3141	33.89	2.73E-11	3.26E-09
hsa-miR-99a-5p	72.57	2.78E-11	3.26E-09
hsa-miR-574-3p	91.34	2.78E-11	3.26E-09
hsa-miR-4508	329.47	3.79E-11	4.33E-09
hsa-miR-6816-5p	158.06	3.89E-11	4.33E-09
hsa-miR-320b	146.38	4.74E-11	5.20E-09
hsa-miR-4739	37.43	4.97E-11	5.22E-09
hsa-miR-15b-5p	100.16	5.01E-11	5.22E-09
hsa-miR-6743-5p	44.81	6.10E-11	5.80E-09
hsa-miR-4758-5p	30.27	7.13E-11	6.13E-09
hsa-miR-762	222.62	7.60E-11	6.13E-09
hsa-let-7a-5p	1439.79	7.75E-11	6.13E-09
hsa-miR-221-3p	104.34	7.77E-11	6.13E-09
hsa-miR-1228-5p	123.98	7.84E-11	6.18E-09
hsa-miR-6786-5p	153.43	8.24E-11	6.39E-09
hsa-miR-6765-5p	93.94	8.26E-11	6.40E-09
hsa-miR-4505	50.95	8.41E-11	6.48E-09
hsa-miR-6749-5p	65.91	8.79E-11	6.76E-09
hsa-miR-6782-5p	13.84	9.41E-11	7.18E-09
hsa-miR-8069	91.17	1.00E-10	7.63E-09
hsa-miR-26a-5p	695.23	1.42E-10	9.92E-09
hsa-miR-100-5p	315.98	1.56E-10	1.02E-08
hsa-miR-29a-3p	67.5	1.61E-10	1.04E-08
hsa-miR-937-5p	85.25	1.68E-10	1.07E-08
hsa-miR-6802-5p	35.74	1.76E-10	1.11E-08
hsa-miR-4488	98.11	2.04E-10	1.28E-08
hsa-miR-181b-5p	41.04	2.21E-10	1.35E-08
hsa-miR-151a-5p	106.49	2.32E-10	1.40E-08
hsa-miR-1225-5p	43.99	2.33E-10	1.40E-08
hsa-miR-6819-5p	19.7	2.38E-10	1.41E-08
hsa-miR-7847-3p	132.26	2.71E-10	1.60E-08
hsa-miR-6800-5p	75.69	2.89E-10	1.69E-08
hsa-miR-6727-5p	49.14	2.92E-10	1.70E-08

hsa-miR-99b-5p	83.38	3.37E-10	1.93E-08
hsa-miR-7107-5p	30.91	3.40E-10	1.94E-08
hsa-miR-4492	72.26	3.61E-10	2.05E-08
hsa-miR-4734	29.73	3.66E-10	2.06E-08
hsa-miR-4459	38.2	4.82E-10	2.69E-08
hsa-miR-3178	89.65	5.52E-10	3.07E-08
hsa-miR-107	66.86	6.05E-10	3.21E-08
hsa-miR-4298	62.1	6.14E-10	3.25E-08
hsa-miR-152-3p	101.91	6.37E-10	3.31E-08
hsa-miR-27b-3p	98.85	6.61E-10	3.34E-08
hsa-miR-3196	62.73	7.00E-10	3.53E-08
hsa-miR-6716-5p	50.51	7.93E-10	3.96E-08
hsa-miR-197-5p	19.83	8.26E-10	4.11E-08
hsa-miR-199a-5p	174.15	8.97E-10	4.32E-08

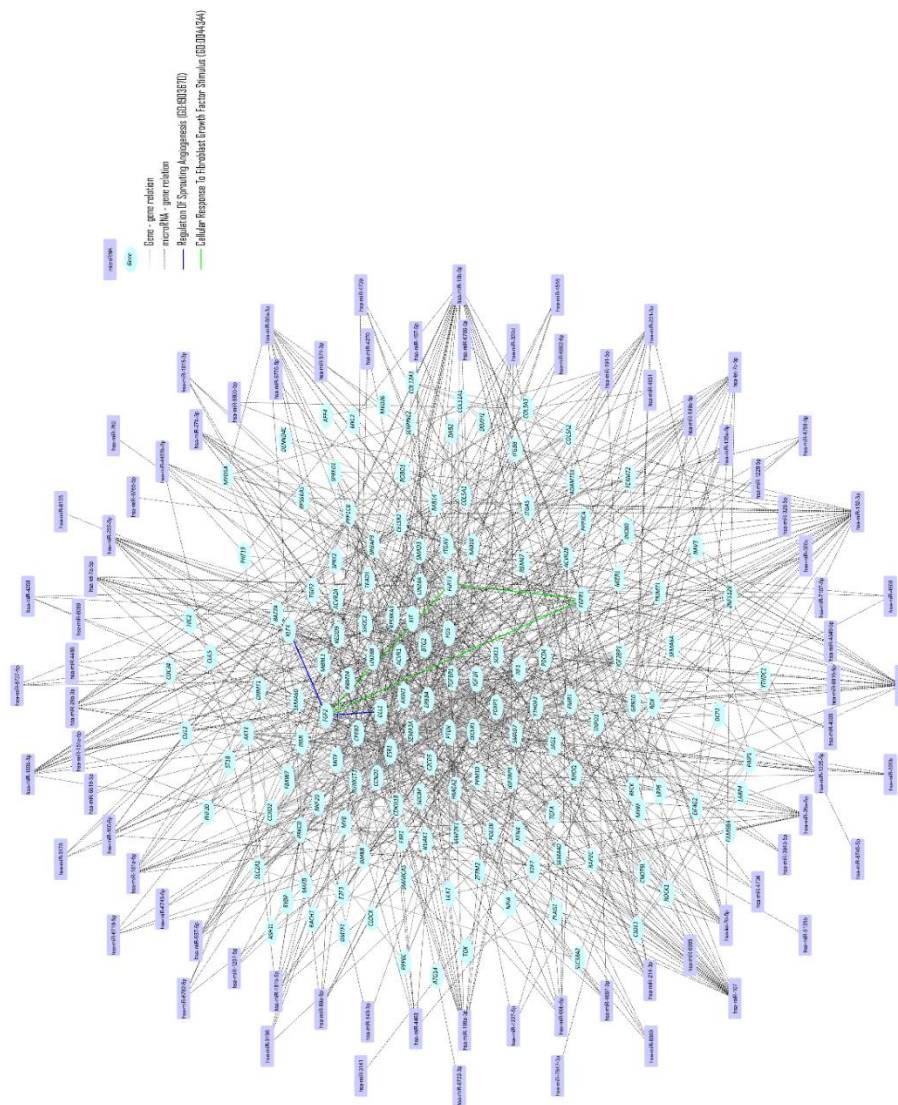


Figura 23. Rede de vias moleculares das células endotelizadas *versus* CTM indiferenciadas

B. Scaffold completo (neovaso com endotélio e musculo liso) *versus* células indiferenciadas

Os resultados mostraram alterações na expressão de 975 miRNAs quando comparado o *scaffold* completo com o controle (ASC indiferenciada). A seguir, selecionamos os miRNAs que possuíam os maiores valores de alteração de FC, para mais ou para menos, com valor de p significativo. Aplicando um $FC \geq 2$, foram identificados 59 miRNAs alterados, sendo a maioria com expressão aumentada para

o *scaffold* completo em comparação com o controle. A seguir, foram filtrados os resultados para identificar os miRNAs estatisticamente significativos, após correção de Bonferroni. Esta análise resultou em 59 miRNAs com $p \leq 0,0008$. Estes miRNAs foram utilizados para predição de genes-alvo no banco de dados microRNA Data Integration Portal (miRDIP). Foram identificados 10.993 genes-alvo dos 59 miRNAs, preferindo-se os genes regulados por mais de um miRNA (optou-se por genes regulados por pelo menos 5 miRNAs). Essa estratégia permitiu identificar os genes e vias moleculares que apresentam *crosstalk* e que podem ser biologicamente relevantes no contexto do estudo. (Tabela suplementar 8 em anexos) Os resultados obtidos mostraram que 428 genes-alvo identificados utilizando estes critérios, apresentados na Figura 24.

Tabela 7. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos *Scaffold* completo versus controle (ASC indiferenciadas).

Transcript ID(Array Design)	Fold Change	P-val	FDR P-val
hsa-miR-222-3p	-8.88	7.79E-10	2.82E-06
hsa-miR-145-5p	4.69	3.17E-08	5.23E-05
hsa-miR-3648	-5.37	5.74E-08	6.04E-05
hsa-miR-221-3p	-6.59	6.84E-08	6.04E-05
hsa-miR-3135b	5.28	7.26E-08	6.26E-05
hsa-miR-23b-5p	-15.69	1.87E-07	0.0001
hsa-miR-4721	-10.22	2.05E-07	0.0002
hsa-miR-6846-5p	-3.4	4.62E-07	0.0003
hsa-miR-184	12.26	8.25E-07	0.0004
hsa-miR-6781-5p	-4.5	1.01E-06	0.0005
hsa-miR-214-5p	-5.12	1.07E-06	0.0005
hsa-miR-99a-5p	3.58	2.24E-06	0.0007
hsa-miR-296-3p	-2.9	3.66E-06	0.0011
hsa-miR-146a-5p	-8.91	5.99E-06	0.0015
hsa-miR-4634	-4.93	8.03E-06	0.002
hsa-mir-6090	-2.81	1.03E-05	0.0025
hsa-miR-6741-5p	-4.14	1.70E-05	0.004
hsa-miR-1229-5p	-3.38	1.90E-05	0.0044
hsa-miR-34a-3p	-3.28	2.09E-05	0.0047
hsa-miR-1224-5p	-4.05	2.72E-05	0.006
hsa-mir-3656	-2.13	3.12E-05	0.0068
hsa-miR-3663-3p	-7.27	3.37E-05	0.0073

hsa-miR-150-3p	-7.05	4.43E-05	0.0088
hsa-miR-23a-5p	-4.75	4.89E-05	0.0094
hsa-miR-6860	-2.81	5.98E-05	0.0096
hsa-miR-3157-3p	2.41	6.66E-05	0.0097
hsa-miR-4685-5p	-3.23	7.81E-05	0.0109
hsa-miR-615-5p	-2.51	9.49E-05	0.0128
hsa-miR-1275	-2.83	0.0001	0.0139
hsa-miR-1587	-3.15	0.0001	0.0157
hsa-miR-874-3p	-5.11	0.0001	0.0157
hsa-miR-6742-5p	-2.62	0.0001	0.0157
hsa-miR-34a-5p	-5.37	0.0001	0.0157
hsa-miR-708-5p	-8.08	0.0001	0.0157
hsa-miR-3679-5p	-3.83	0.0002	0.017
hsa-miR-574-3p	2.07	0.0002	0.0175
hsa-miR-1182	-2.12	0.0002	0.0183
hsa-miR-195-5p	11.16	0.0002	0.0183
hsa-miR-6165	-3.16	0.0002	0.0219
hsa-miR-143-3p	2.67	0.0002	0.0221
hsa-miR-7107-5p	2.12	0.0003	0.0222
hsa-miR-30b-5p	-8.6	0.0003	0.0222
hsa-miR-181a-5p	-2.27	0.0003	0.0236
hsa-miR-328-3p	-3.34	0.0003	0.0246
hsa-miR-4269	-2.49	0.0004	0.0278
hsa-miR-6889-5p	-2.32	0.0004	0.0288
hsa-miR-501-3p	3.37	0.0004	0.0297
hsa-miR-3180-3p	-2.35	0.0004	0.0297
hsa-miR-1909-3p	-2.52	0.0004	0.0308
hsa-miR-6824-5p	-3.06	0.0004	0.0312
hsa-miR-502-3p	3.87	0.0005	0.0315
hsa-miR-557	-3.28	0.0005	0.0321
hsa-miR-6870-5p	-4.78	0.0005	0.0344
hsa-miR-933	-4.31	0.0005	0.035
hsa-miR-197-5p	-2.24	0.0006	0.0401
hsa-miR-500a-3p	3.69	0.0006	0.0418
hsa-miR-4730	-2.47	0.0007	0.0426
hsa-miR-421	-4.08	0.0007	0.0434
hsa-miR-504-3p	-2.8	0.0008	0.0481

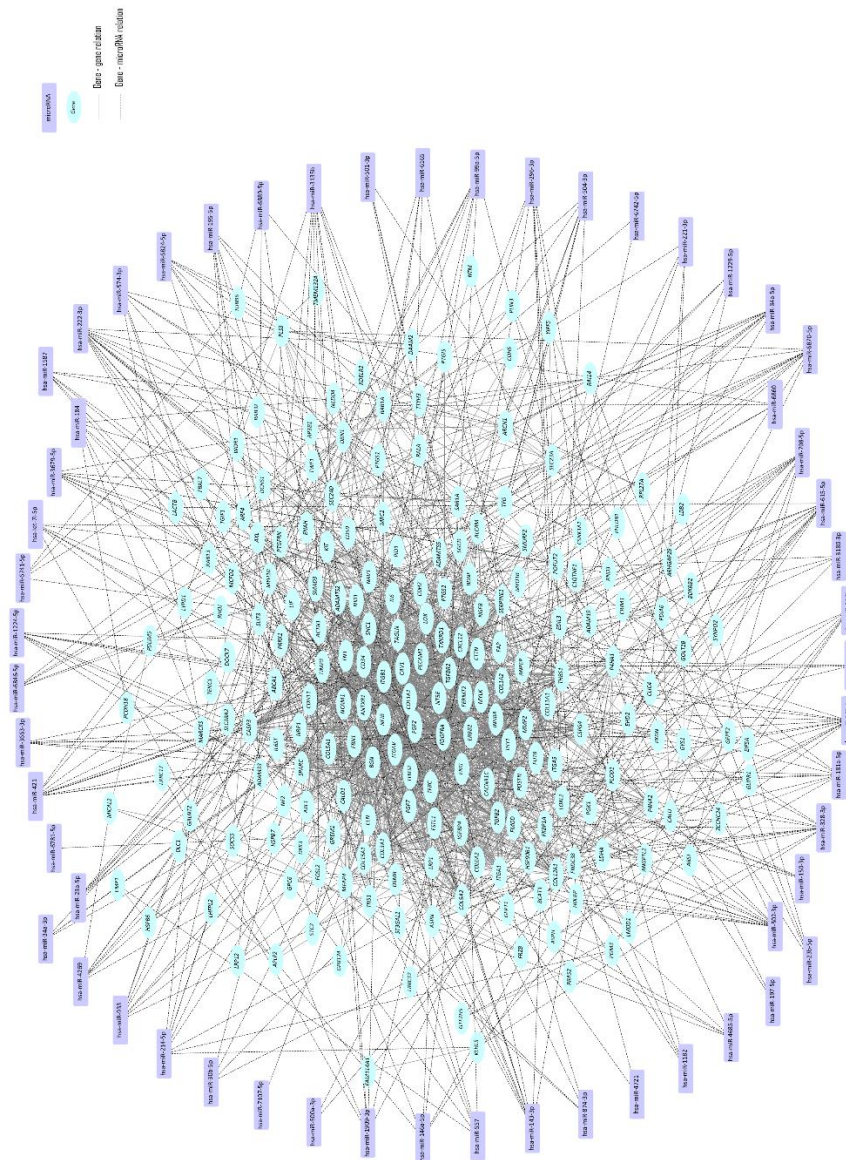


Figura 24. Rede de vias moleculares das células musculares lisas *versus* CTM indiferenciadas

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os *scaffolds* biológicos são uma grande fonte de biomateriais, com vantagens como baixa toxicidade e baixa imunogenicidade, além de prover um ambiente favorável à adesão e multiplicação celular. Portanto, ao se usar o *scaffold* biológico, há uma arquitetura da MEC nativa é altamente preservada e o conteúdo do antígeno é removido pelo processo de descelularização.⁶⁷

Na literatura científica são apresentados diversos agentes descelularizantes e diferentes metodologias que são empregadas para se obter os melhores resultados de decelularização de tecidos. No entanto, o presente estudo baseia-se em um protocolo prático, com alta eficiência e rapidez no processo. Mas não só isso, estudou-se as propriedades do *scaffold* em promover um ambiente otimizado para adesão e colonização celular, especificamente para o TEBV.^{8,62-67,158-162} Os estudos experimentais anteriores de nossa equipe demonstraram que a VCI de coelho pode ser descelularizada, mantendo a estrutura da MEC, servindo, portanto, como um *scaffold* promissor para receber as ASCs.⁶³ Também foi determinado que o processo de descelularização da veia não causa toxicidade residual significativa ou degradação das propriedades de resistência da MEC.⁶³ Porém, a adesão e proliferação celular não mostraram um padrão suficientemente regular durante as várias repetições do método, principalmente no que se refere ao número de células, suscitando que este experimento fosse além do que já fora obtido. Assim, este experimento foi desenhado para verificar as possíveis variáveis que levariam aos melhores resultados: o número de células, o tipo de agente descelularizantes e os tempos de cultura.

Estudos publicados demonstraram que, para uma recelularização adequada de um *scaffold* vascular, são necessários pelo menos 1×10^6 células por cm^2 e pelo menos duas semanas de cultivo, o que também foi observado em nossos experimentos com *scaffolds* de VCI semeados com 1×10^6 ASC.^{81,108,113} Estudos concluíram que a descelularização das veias pelo protocolo SDS é capaz de manter a MEC bem preservada, estrutura de membrana e resistência suficiente para enxerto

vascular, corroborado por nossos achados.^{64,130} Por outro lado, Zhou et al.¹⁶² afirmam que a descelularização com SDS pode ser prejudicial às proteínas estruturais e de sinalização, como o colágeno de alguns tecidos cardíacos que permanecem danificados, apesar de remover células com sucesso. De acordo com nossos melhores protocolos, o SDS foi considerado o mais favorável às células semeadas, principalmente pela brevidade da exposição.

A comparação entre os resultados obtidos por métodos histológicos diferentes, obteve-se resultados também diferentes, sendo que o processo de fixação para confecção de blocos parafinizados e cortes para histologia HE convencional foi inferior na detecção do número de células semeadas em comparação com o método que utilizou material fresco congelado e imunofluorescência. Possivelmente, isso se deva a fragilidade com que as células ainda imaturas tenham se aderido à luz dos *scaffolds*, e dessa forma, os resultados histológicos possam ser prejudicados pelo processamento físico necessário para a produção de blocos de parafinas e coloração. Portanto, o método de imunofluorescência com marcação nuclear com DAPI apresentou maior sensibilidade na identificação dos núcleos celulares, com concordância metodológica parcial entre os métodos na análise estatística, seguindo a literatura científica.¹⁶³ Assim, para os primeiros ensaios de adesão celular, concluiu-se que o método por imunofluorescência pode ser vantajoso em relação à histologia convencional.

Após a comprovação dos métodos científicos, este estudo conseguiu obter os melhores tempos necessários para cada etapa de produção do nevaso completo, sendo que os métodos de adesão celular nos *scaffolds* de VCI, com a recelularização na camada interna com endotélio vascular em cultura por 4 semanas, este estudo diferenciou ASC em músculo liso por 3 semanas, e acrescentou na fase externa do scaffold endotelizado em cultura por 4 semanas para promover a integração das células na MEC, para se produzir o nevaso completo. Outro estudo demonstrou que o complexo adesão célula-matriz agem na proliferação celular e fornecem a migração celular das CML e induzem a sua migração intracelular para a matriz,

permitindo a sua remodelação.¹⁶⁴ A camada de músculo liso desempenha função importante na manutenção da homeostase do sistema sanguíneo, produzindo assim uma camada de músculo liso funcional, que é indispensável para a construção completa de vasos sanguíneos por meio de abordagem de engenharia de tecidos.⁸⁸ Neste estudo, após o período de 4 semanas de endotelização do scaffold em cultura, acrescentamos 1×10^6 de CML, comprovadas fenotipicamente através de análise por IHQ (anti- α actina 1a4 e HHF35), na face externa do scaffold endotelizado, o que foi possível observar a proliferação e alguma migração celular para MEC do scaffold. Corroborando com o que se espera e é apresentado na literatura, onde visam que um scaffold com ambiente propício para uma melhor adesão, proliferação e migração celular em matriz tridimensional.^{56-58,165}

É imprescindível e de grande importância na produção de um neovaso funcional por engenharia de tecidos, que sejam melhor compreendidas as vias de regulação de expressão de genes e ciclo/proliferação celular para avaliação de possíveis expressões diminuídas de genes, e o comportamento biomolecular envolvido, justificando avanços tanto no processo saúde como também nos processos de possível desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Os MIRNAS tem um padrão específico de expressão e regulação de genes em células-tronco embrionárias, sendo os mais expressos os miR-17-92m miR-290-295, miR-302, miR-106b-25 e, que regulam as fases do ciclo celular e diferenciação celular.^{111,112,166-170} Em nosso estudo realizamos a comparação entre os scaffolds recelularizados tanto com células endoteliais, como neovaso recelularizado completo com células endoteliais e musculares, com o que consideramos o controle *in natura* de veia, além da comparação com as ASC cultivadas. A análise dos miRNA demonstrou uma grande variação de genes reguladores aumentados do sistema circulatório, relacionados aos processos naturais de formação e desenvolvimento, embrionário e adulto, das células constituintes do sistema cardiovascular, mas também algumas vias envolvidas nos processos de doença.

Os miRNAs, encontrados, têm papel fundamental na via de regulação do

controle de diferenciação de células indiferenciadas humanas em direção à linhagem endotelial, formação de vasos sanguíneos e na autorrenovação de células embrionárias.¹⁷¹ A importância do controle na regulação de células pela expressão de miRNAs no desenvolvimento do sistema cardiovascular vem sendo estudada cada vez mais, demonstrado que a perda desta função, pode ocasionar no comprometimento da diferenciação e desenvolvimento das células cardíacas e da formação dos vasos sanguíneos, causando agnêsias no sistema cardiovascular.¹²³ Alguns estudos, apresentam o papel dos miRNAs na regulação da vasculogênese de doenças vasculares, porém a maioria foca na regulação de fenótipos das células em sua migração e proliferação. Entretanto, outros estudos evidenciaram um papel individual da miRNA na diferenciação e regulação de gene específicos das células endoteliais.^{125,146,172,173}

Portanto, a importância da análise de expressão dos miRNAs reguladores da vasculogênese e dos genes individuais de diferenciação de células endoteliais específicas que agem diretamente no desenvolvimento do sistema cardiovascular ainda se encontra em grande avanço. Nosso estudo, visamos utilizar a análise de expressão de genes miRNA em neovaso produzido por TEBV, para comprovar a presença de genes específicos na recelularização de vasos descelularizados, e as vias genéticas específicas durante o processo de indução vascular, encontrando diversas vias altamente expressas e ativas, trazendo mais conhecimento sobre a evolução da TEBV e seus mecanismos envolvidos.

Nosso estudo apresenta limitações: trata-se de um estudo experimental em coelhos e os achados não podem ser transladados diretamente para o que ocorre nos seres humanos sem comprovação espécie-específica; as amostras foram limitadas a 5 repetições; miRNAs são conservados entre espécies, mas não há um kit específico para coelhos e as plataformas disponíveis também não são específicas para esse modelo; ainda não foram realizados estudos de compatibilidade e resistência desse modelo de TEBV com implante na circulação do animal, sendo este a próxima etapa dos estudos.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O modelo biológico de *scaffold* de veia cava inferior descelularizada e recelularizado com células endoteliais e músculo liso obtidos por diferenciação celular de células-tronco derivadas de tecido adiposo, *in vitro*, demonstrou boa celularização e diferenciação celular, comprovado por caracterização morfológica. Os tempos necessários para completa obtenção do neovaso pelas técnicas empregadas foi de 8 semanas, sendo 4 semanas para endotelização e mais 4 semanas para integração das células musculares lisas. A análise do perfil global de expressão de miRNAs sugere que inúmeras vias de regulação genética estão envolvidas nos processos de diferenciação endotelial e de músculos lisos da parede vascular, trazendo luz aos mecanismos biomoleculares necessários para a engenharia de tecidos em vasos sanguíneos como uma proposta promissora para o fornecimento de substitutos vasculares no futuro.

Referências

8. Referências

1. Guyton, A.C. e Hall J.E.– Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017.
2. CARVALHO, MHC et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.
3. Evora, PRB et al. Oxido nítrico e substância vasoativas derivadas do endotélio: papel no controle do tônus vascular. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo, p. 129-37, 1996.
4. GUADAGNIN, V. et al. Influência do estresse oxidativo sobre a regulação do tônus vascular e a eficácia das terapias antioxidantes. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 12, n. 1, p. 82-89, 2015.
5. CARVALHO, Maria Helena Catelli et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.
6. Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, Körbelin J. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. Cells. 2021 Oct 10;10(10):2712.
7. Thakore P, Ali S, Earley S. Regulation of vascular tone by transient receptor potential ankyrin 1 channels. Curr Top Membr. 2020;85:119-150.
8. Pellegata A. F., Asnaghi M. A., Stefani I., et al. Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. BioMed Research International, 2013, 1–8.
9. Yoshida,WB – O processo aterosclerótico : da disfunção endotelial à lesão complexa. In: Kauffman. Doença aterosclerótica periférica , BBS ed., 2^a ed., 2007.
10. Allison M.A, Ho E., Denenberg J.O.,et al. Ethnic-specific prevalence of peripheral arterial disease in the United States. Am J Prev Med. 2007;32:328–333.
11. Selvin E., Erlinger T.P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. Circulation. 2004;110:738–743.
12. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. Circulation research 2015;116:1509-1526.
13. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. Circulation research 2016;118:535-546.
14. TASC Steering Committee, Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkes GR, Dormandy J, Razavi M, Reekers J, Norgren L. An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Vasc Med. 2015 Oct;20(5):465-78.

15. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Journal of vascular surgery* 2007;45:S5-S67.
16. Lane R, Harwood A, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Dec 26;12(12):CD000990.
17. Lambert M, Belch J. Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *Journal of internal medicine* 2013;274:295-307
18. Yoshida WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros. *J Vasc Br* 2005;4 316-8.
19. Uccioli L, Meloni M, Izzo V, Giurato L, Merolla S, Gandini R. Critical limb ischemia: current challenges and future prospects. *Vasc Health Risk Manag*. 2018;14:63-74.
20. Reis PEO. Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br*. 2005;4:366-70.
21. Maffei, F.H.A et al. Doenças vasculares periféricas. Guanabara Koogan, 2016.
22. Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's vascular surgery. Elsevier Health Sciences, 2014.
23. Montrieff T, Koyfman A, Long B. Coronary artery bypass graft surgery complications: A review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med*. 2018 Dec;36(12):2289-2297
24. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. *In vivo* applications of electrospun tissue- engineered vascular grafts: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2014; 20:628- 640.
25. Sukovatykh BS, Belikov LN, Sukovatykh MB, Sidorov DV, Inarkhov MA, Inokhodova EB. Rezul'taty primeneniya razlichnykh sposobov avtovenoznogo bedrenno-podkolennogo shuntirovaniya nizhe shcheli kolennogo sustava [Results of using various methods of autovenous femoropopliteal bypass grafting below the knee-joint fissure]. *Angiol Sosud Khir*. 2016;22(4):137-143. Russian.
26. Gaudino M, Taggart D, Suma H, Puskas JD, Crea F, Massetti M. The choice of conduits in coronary artery bypass surgery. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66:1729- 1737.
27. Leroy O, Meybeck A, Sarraz-Bournet B, d'Elia P, Legout L. Vascular graft infections. *Current opinion in infectious diseases* 2012; 25:154-158.
28. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*. 1991;88:753-59.
29. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:S513-16.

30. Deutsch M, Meinhart J, Vesely M, et al. *In vitro* endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: a clinical case report after 41 months of implantation. *J Vasc Surg*. 1997;25:757–63.
31. Zilla P, Fasol R, Deutsch M, et al. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg*. 1987;6:535–41
32. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403–30.
33. He J, Zhang X, Xia X, Han M, Li F, Li C, Li Y, Gao D. Organoid technology for tissue engineering. *J Mol Cell Biol*. 2020 Aug 1;12(8):569–579.
34. Sahakyants T, Vacanti JP. Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. *Pediatr Surg Int*. 2020 Oct;36(10):1123–1133.
35. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016 Jan;51(1):8–12.
36. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14;68:29–40.
37. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE. Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective. *Molecules*. 2021 Apr 26;26(9):2518.
38. Niklason L.E, Lawson J.H. Bioengineered human blood vessels. *Science*. 2020 Oct 9;370(6513):eaaw8682.
39. Devillard C.D., Marquette C.A. Vascular Tissue Engineering: Challenges and Requirements for an Ideal Large Scale Blood Vessel. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Oct 4;9:721843.
40. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Dec;19(6):485–502.
41. Du J., Hu X., Su Y. et al. Gelatin/sodium alginate hydrogel-coated decellularized porcine coronary artery to construct bilayer tissue engineered blood vessels. *Int. J. Biol. Macromol*. 2022, 209, 2070–2083.
42. Bertanha M. Prospects for applications of stem cells in vascular surgery. *Jornal Vascular Brasileiro*, 2016, 15, 173–175.
43. Wang Z, Mithieux SM, Weiss AS. Fabrication Techniques for Vascular and Vascularized Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2019 Oct;8(19):e1900742.
44. Cai, Z., Gu, Y., Cheng, J., et al. Decellularization, cross-linking and heparin immobilization of porcine carotid arteries for tissue engineering vascular grafts. *Cell and Tissue Banking*, 20(4), 569– 578.
45. Pellegata A.F., Asnaghi M.A., Stefani I., et al. Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
46. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2014 Feb;42(2):323–37.

47. Guan Y, Yang B, Xu W, et al. Cell-Derived Extracellular Matrix Materials for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022 Oct;28(5):1007-1021.
48. Ge F, Lu Y, Li Q, Zhang X. Decellularized Extracellular Matrices for Tissue Engineering and Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1250:15-31.
49. Iwaki R, Shoji T, Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shinoka T. Current status of developing tissue engineering vascular technologies. *Expert Opin Biol Ther.* 2022 Mar;22(3):433-440.
50. Stoltz J, de Isla N, Li Y, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. *Stem Cells Int* 2015; 2015:734731.
51. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. Springer, 2011.
52. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Básica.* 9 ed. Elsevier; 2016.
53. Dong JD, Huang JH, Gao F, Zhu ZH, Zhang J. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering of small-diameter blood vessels. *Vascular.* 2011 Aug;19(4):206-13
54. Ajit A, Santhosh Kumar TR, Krishnan LK. Engineered Human Adipose-Derived Stem Cells Inducing Endothelial Lineage and Angiogenic Response. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019;25(3):148-159
55. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue- engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47-56.
56. Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, Bendeck MP. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol* 2006;168:1697-709.
57. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth- muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* 2006;119:4994- 5005.
58. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, Yamada M, Sugimoto K, Daida H. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: *in vitro* differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation* 2003;107:2078-81.
59. Song Y, Feijen J, Grijpma D, Poot A. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2011;49:357- 374.
60. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell.* 2018;22(3):340-354.
61. Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries *in vitro*. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(11):2103-18.
62. Bertanha M, Moroz A, Almeida R, et al. Tissue-engineered blood vessel

- substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *Journal Vascular Surgery* 2014;59:1677-1685.
63. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *Experimental cell research* 2014;326:103-111.
64. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, 32, 3233-3243
65. Nagase H, Visse R. Matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, 2006, 68, 562-573.
66. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14, 608-616.
67. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-83.
68. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and *in vivo* relevance. *Methods*. 2015 Aug;84:25-34.
69. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Apr 25;10:805299.
70. Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 30;21(15):5447.
71. Yu XX, Wan CX, Chen HQ. Preparation and endothelialization of decellularized vascular scaffold for tissue-engineered blood vessel. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):319-26.
72. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, Sung JH, Lu CH, Wei JR, Wang ZW, Huang SJ, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):621-30.
73. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater*. 2021 Sep 23;10:15-31.
74. Somuncu ÖS. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1212:71- 85
75. Aldridge A, Desai A, Owston H, Jennings LM, Fisher J, Rooney P, Kearney JN, Ingham E, Wilshaw SP. Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft. *Cell Tissue Bank*. 2018 Sep;19(3):287-300.
76. Nuruse K. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005;54:1823-8.
77. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell*

- Mol Med 2007;11:945- 57.
78. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54:132-41.
79. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells.* 2019 Jul 28;8(8):784
80. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep;76(17):3323- 3348.
81. Freiman A, Shandalov Y, Rosenfeld D, Shor E, Ben-David D, Meretzki S, Levenberg S, Egozi D. Engineering vascularized flaps using adipose-derived microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):e130-e141.
82. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):641-8.
83. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8:301-16.
84. Vigorito AC. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31:280-284
85. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J Appl Genet* 2007; 48:307-19.
86. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells.* 2018 Feb;36(2):161-171.
87. Pérez S, Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke* 2010;62:389-420.
88. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
89. Bkaily G, Abou Abdallah N, Simon Y, Jazzar A, Jacques D. Vascular smooth muscle remodeling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020 Aug 27:1-8.
90. Pate M, Damarla V, Chi DS, Negi S, Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv Clin Chem* 2010;52:109-30.
91. Van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2011.
92. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 3ª ed., 2017.
93. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive

- species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res.* 2001;89(3):224-36.
94. Durgin BG, Straub AC. Redox control of vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Lab Invest.* 2018;98(10):1254-1262.
95. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87(3):179-83.
96. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13–40.
97. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 2015 Jul 15;593(14):3013-30.
98. Shang Y, Yoshida T, Amendt BA, Martin JF, Owens GK. Pitx2 is functionally important in the early stages of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Cell Biol.* 2008;181:461–473.
99. Kami D., Shiojima I., Makino H., Matsumoto K, et al. “Gremlin Enhances the Determined Path to Cardiomyogenesis.” *PLoS ONE* 3 (2008): e2407
100. Parvizi M., Bolhuis-Versteeg L.A., Poot A.A., Harmsen M.C., Efficient generation of smooth muscle cells from adipose-derived stromal cells by 3D mechanical stimulation can substitute the use of growth factors in vascular tissue engineering, *Biotechnol. J.* 11 (2016) 932-944.
101. Dan P., Velot E., Decot V., Menu P., The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells, *J. Cell. Sci.* 128 (2015) 2415-2422.
102. Yoshida T., Owens G.K. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity, *Circ. Res.* 96 (2005) 280-291.
103. L.P. Neff, B.W. Tillman, S.K. Yazdani, M.A. Machingal, J.J. Yoo, S. Soker, B.W. Bernish, R.L. Geary, G.J. Christ, Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels *in vivo*, *J. Vasc. Surg.* 53 (2011) 426-434.
104. J.A. de Villiers, N. Houreld, H. Abrahamse, Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine, *Stem Cell. Rev.* 5 (2009) 256-265.
105. Wang C., Yin S., Cen L.,et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4, *Tissue Eng. Part A.* 16 (2010) 1201-1213.
106. Kim M.R., Jeon E.S., Kim Y.M.,et al. Thromboxane a(2) induces differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells, *Stem Cells.* 27 (2009) 191-199.
107. Kim Y.M., Jeon E.S., Kim M.R.,et al. Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 2482-2491.

108. Zhang X, Bendeck MP, Simmons CA, Santerre JP. Deriving vascular smooth muscle cells from mesenchymal stromal cells: Evolving differentiation strategies and current understanding of their mechanisms. *Biomaterials*. 2017 Nov;145:9-22.
109. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):376-85.
110. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1812 (5): 592–601.
111. Wang Y, Blelloch R. Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Research*. 2009;69(10):4093–4096.
112. Wang Y, Blelloch R. Cell cycle regulation by microRNAs in stem cells. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2011;53:459–472.
113. Yu Z, et al. miRNAs regulam a auto-renovação e diferenciação das células-tronco. *Fronteiras em genética*. 2012; 3 : 191
114. Rhoades, M.W., et al. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520.
115. Lai, E.C. MicroRNAs are complementary to 3'_UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation. *Nat. Genet.* 2002. 30: 363-364.
116. Xie, X., *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3 UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005. 434: 338-345.
117. Osada, H. and Takahashi, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2007.28: 2-12.
118. Sandberg, R., *et al.* Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 2008. 320: 1643-1647.
119. Cheng, C., *et al.* The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics*. 2009. 10: 431.
120. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129: 1401– 1414.
121. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH et al. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12135– 12140.
122. Wang Y, Medvid R, Melton C et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2007; 39: 380– 385.
123. Yang WJ, Yang DD, Na S et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005; 280: 9330– 9335.
124. Kane NM, Howard L, Descamps B et al. Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* 2012; 30: 643– 654.
125. Yoo JK, Kim J, Choi SJ et al. Discovery and characterization of novel microRNAs during endothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2049– 2057.

126. Yoo JK, Kim J, Choi SJ et al. The hsa-miR-5739 modulates the endoglin network in endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 258– 262.
127. Cleary M.A., et al.. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med* 18, 394, 2012; Naito Y., et al.. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 312, 2011
128. Zampetaki A., and Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res* 110, 508, 2012
129. Song Z., and Li G. Role of specific microRNAs in regulation of vascular smooth muscle cell differentiation and the response to injury. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 246, 2010
130. Xin M., et al.. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev* 23, 2166, 2009
131. Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular research*.1999;41:345–360
132. Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:104–111.
133. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:812–81
134. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. 2004;84:767–801.
135. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22:1276–1312.
136. Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(3):266-277. doi: 10.2174/1568009617666170630142725.
137. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473(7347), 298-307.
138. Chung. AS.; Lee, J.; Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, 10(7), 505-514.
139. Ribatti, D.; Conconi, MT.; Nussdorfer, GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol. Rev.*, 2007, 59, 185-205.
140. Kuehnbacher, A.; Urbich, C.; Zeiher, AM.; Dimmeler, S. Role of dicer and drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.*, 2007, 101(1), 59-68.
141. Wang, S.; Olson, EN. AngiomiRs-Key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2009, 19(3), 205-211
142. Tili E, Michaille JJ, Calin GA. Expressão e função de micro-RNAs em células imunes durante o estado normal ou de doença. *Int J Med Sci*. 2008 ; 5 :73-79

143. Gallach, S.; Calabuig-Fariñas S.; Jantus-Lewintre, E.; Camps, C. MicroRNAs: Promising new antiangiogenic targets in cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 1-14.
144. Chang, S-H.; Hla, T. Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. *Trends Mol. Med.*, 2011, 17(11), 650- 658.
145. Carmeliet, P.; Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801), 249-257.
146. Fish JE, Santoro MM, Morton SU et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008; 15: 272– 284.
147. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008; 283: 15878– 15883.
148. Lee DY, Deng Z, Wang CH et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20350– 20355.
149. BA.; Gao, D.; Johns, C.; Mattick, J.S.; Wilton, S.D.; Ferro. V.; McMillan. N.A.; Swarbrick, A.; Mittal. V.; Mellick, A.S. MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res.*, 2013, 73(1), 341-352
150. Anand, S.; Majeti, B.K.; Acevedo, L.M.; Murphy, E. A.; Mukthavaram, R.; Schepke, L.; Huang, M.; Shields, D.J.; Lindquist, J.N.; Lapinski, P.E.; King, P.D.; Weis, S.M.; Cheres, D.A. MicroRNA132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.*, 2010, 16(8), 909-914.
151. Heusschen, R.; Gink, M.V.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L.; MicroRNAs in the tumor endothelium: Novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, 2010, 1805(1), 87-96.
152. Pourrajab, F.; Zarch, A.Vakili.; Hekmatimoghaddam, S.; Khormizi, M.R-Z. MicroRNAs; easy and potent targets in optimizing therapeutic methods in reparative angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, 2015, 19(12), 2702-2714.
153. Wang, R.; Zhao, N.; Li, S.; Fang, JH.; Chen, MX.; Yang, J.; Jia, WH.; Yuan, Y.; Zhuang, SM. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42. *Hepatology*, 2013, 58(2), 642-653.
154. Poliseno, L.; Tuccoli, A.; Mariani, L.; Evangelista, M.; Citti, L.; Woods, K.; Mercatanti, A.; Hammond, S.; Rainaldi, G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 2006, 108(9), 3068-3071.
155. Slevin, M.; Krupinski, J.; Gaffney, J.; Matou, S.; West, D.; Delisser, H.; Savani, RC.; Kumar, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.*, 2007, 26(1), 58-68.
156. Hua, Z.; Lv, Q.; Ye, W.; Wong, C-KA.; Cai, G.; Gu, D; Ji, Y.; Zhao, C.; Wang, J.; Young, B.B.; Zhang, Y. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PloS One*, 2006, 1(1), 1-12.

157. Wu, S.Y.; Rupaimoole, R.; Shen, F.; Pradeep, S.; Pecot, C.V.; Ivan, C.; Nagaraja, A.S.; Gharpure, K.M.; Pham, E.; Hatakeyama, H.; McGuire, M.H.; Haemmerle, M.; Vidal-Anaya, V.; Olsen, C.; Rodriguez-Aguayo, C.; Filant, J.; Ehsanipour, E.A.; Herbrich, S.M.; Maiti, S.N.; Huang, L.; Kim, J.H.; Zhang, X.; Han, H.D.; ArmaizPena, G.N.; Seviour, E.G.; Tucker, S.; Zhang, M.; Yang, D.; Cooper, L.J.; Ali-Fehmi, R.; Bar-Eli, M.; Lee, J.S.; Ram, P.T.; Baggerly, K.A.; Lopez-Berestein, G.; Hung, M.C.; Sood, A.K. A miR192-EGR1-HOXB9 regulatory network controls the angiogenic switch in cancer. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 1-14
158. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009;30:3749-56.
159. Singer MM, Tjeerdema RS. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Reviews of environmental contamination and toxicology*: Springer, 1993:95-149.
160. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004;40(1):146-53
161. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A, Lichtenberg A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs.* 2010;34(3):206-10
162. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010;31(9):2549-54.
163. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299- 31.
164. Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature.* 1997;385:537–540.
165. Wang C, Cen L, Yin S, Liu Q, Liu W, Cao Y, Cui L. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2010;31:621-30.
166. Dalton S. Expondo dimensões ocultas do controle do ciclo de células-tronco embrionárias. *Cell Stem Cell.* 2009; 4 (1): 9–10. Stein GS, et al. Uma perspectiva arquitetônica do controle do ciclo celular na transição do ciclo celular da fase G1 / S. *Journal of Cellular Physiology.* 2006; 209 (3): 706–710.
167. Hao J, Duan FF, Wang Y. MicroRNAs and RNA binding protein regulators of microRNAs in the control of pluripotency and reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2017;46:95–103.
168. Li N, et al. microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem Cell*

- Research & Therapy. 2017;8(1):110.
- 169.** Lichner Z, et al. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation*. 2011;81(1):11–24.
- 170.** Houbavii HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Developmental Cell*. 2003;5(2):351–358.
- 171.** Luo Z, Wen G, Wang G, Pu X, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q. MicroRNA-200C and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1. *Stem Cells*. 2013 Sep;31(9):1749-62.
- 172.** Wang S, Aurora AB, Johnson BA et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008; 15: 261– 271.
- 173.** Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008; 111: 1217– 1226

Anexos

ANEXOS

Anexo 1

Vein decellularization protocol

Material

- Conical tube
- Injection water
- Sodium duodecyl sulfate (SDS) 1%
- Clean and fragmented sample

Solution preparation Sodium duodecyl sulfate (SDS) 1%: 200mL of ultrafiltered H₂O + 2.5g SDS (molecular weight 288.38, concentration 0.35 M, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, USA)

Ps. Each conical tube must be filled with 25 mL of the 1% SDS solution.

Procedure

In a laminar flow chamber, sterile environment, the samples (veins) must go through the cleaning procedure to ensure that there are no remains of blood and fat compound, then separated into fragments according to the study protocol. The fragmented samples will be stored at -80°C until the moment of decellularization.

Before the decellularization process, the fragments will be thawed at room temperature, washed with saline solution, and stored 5 samples per conical tube containing 25mL of 1% SDS solution, seal the lid with parafilm to prevent leakage. Place the tubes in a horizontal position on the shaker tray and fix them with tape, keep stirring at 1200rpm for 2 hours at 37°C (Shaker News Brunswick Scientific® with the controlled temperature at 37°C). The fragments went through a cycle of 3 washes with sterile saline solution and were conditioned and preserved in a refrigerator at 4°C in a sterile solution containing antibiotic and antifungal until the moment of use in culture.

Observations: Use mask for handling SDS, mucosa irritant substance.

Anexo 2



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



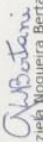


Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012.

CERTIFICADO Nº 1279/2018-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: **"Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: Modelo em Coelho - IN VITRO"**, conduzida pela Pesquisadora Principal: **Lenize da Silva Rodrigues**, Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha registrada com o nº 1279/2018, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 25 de outubro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31 de março de 2021
Espécie/Linhagem/Raça	Coelho
Nº de animais	30
Idade/Peso	3 meses - 2,5gramas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério UNIPEX - FMB



Graziela Wogueira Bertani
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretária: cguia@fmb.unesp.br

Tabelas suplementares

Tabela suplementar 1. Análise dos miRNA das vias Ontológicas, *scaffold* endotelizado *versus* controle *in natura* (base de dados Jensen TISSUES)

Term	P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Vascular cell	0.591567	1.01749793	0.534166929	EDN1; THBS1
Vascular smooth muscle	0.343972	2.608998906	2.784310624	CLCN5
Vascular system	0.010736	1.419522617	6.436347728	VEZT; BMPR2; SNAP23; HDLBP; BZW1; LRRC1; CCND1; LAMP2; TNPO1; RAB8B; ACTR2; EDN1; DUSP6; FOXP1; DKK3; ENAH; RCN1; TMEM135; HNRNPUL1; TBL1XR1; SUB1; MAP1B; PAPP; ADAM9; BCAT1; TP53; LRRC59; MTPN; SRSF1; ADD3; FAM214B; THBS1; CALD1; G3BP1; NRIP1; CD59; FOPNL; PDLIM5; SLC38A2; SPTBN1; CD164; RRM2; GALNT1; SURF4; CRIM1; HMGA1; NAP1L1; COL1A1; UFM1; DLC1; COL5A2; CALU; TPP1; CALM1; ZNF410; EIF4G2
Vascular tissue	0.156167	2.321881092	4.311336958	CYTH3; EDN1; XK
Vasculature	0.022924	2.099004425	7.924969693	EDN1; BMPR2; XK; PLXND1; FZD4; PDGFB; PDE5A; IGF1; TP53; THBS1; LYVE1

Tabela suplementar 2. Análise da função biológica para o Scaffold endotelizado versus controle *in natura* - base de dados GO Biological Process 2021

Term	P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
vascular associated smooth muscle contraction (GO:0014829)	0.312507	2.98186933	3.468300338	EDN1
vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0048010)	0.03301	2.44447504	8.337949023	VAV3; ROCK1; ITGB3; NCK2; ELMO1; SULF1; PAK2
vascular endothelial growth factor signaling pathway (GO:0038084)	0.48099	1.60511698	1.174800806	NUS1
vascular process in circulatory system (GO:0003018)	0.456089	1.73896791	1.365204984	ROCK1
vascular transport (GO:0010232)	0.038151	2.20611617	7.205627446	SLC5A6; INSR; SLC1A2; SLC1A4; SLC6A1; SLC4A4; SLC5A3; SLC38A2
vasculature development (GO:0001944)	0.181225	2.78495801	4.756759337	BMPR2; ACVR2B
vasculogenesis (GO:0001570)	0.190507	2.08936404	3.464307373	TGFBR3; HAS2; ITGB8
vasoconstriction (GO:0042310)	0.402653	2.08698031	1.89848669	EDN1
vasodilation (GO:0042311)	0.132389	3.48174516	7.040130168	ADRB3; ADRB2
venous blood vessel development (GO:0060841)	0.048724	6.96568091	21.04737332	BMPR2; ACVR2B
ventricular cardiac muscle cell action potential (GO:0086005)	0.198049	2.61076123	4.227450253	NEDD4L; SCN5A
ventricular cardiac muscle cell differentiation (GO:0055012)	0.208774	5.2190919	8.175727717	MEF2C
ventricular cardiac muscle tissue development (GO:0003229)	0.318159	1.81551502	2.079137753	TGFBR3; TBX5
ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055010)	0.068115	2.78887669	7.492461277	TGFBR3; SMAD4; RBPJ; TGFBF1
ventricular compact myocardium morphogenesis (GO:0003223)	0.027736	10.4496166	37.4621802	TGFBR3; TGFBF1
ventricular septum development (GO:0003281)	0.001492	4.73845389	30.83519431	TGFBR3; SMAD4; BMPR2; SOX11; MDM4; TBX5; TGFBF1
ventricular septum morphogenesis (GO:0060412)	0.008103	4.5537506	21.92867427	TGFBR3; SMAD4; BMPR2; SOX11; TGFBF1
ventricular trabecula myocardium morphogenesis (GO:0003222)	0.048724	6.96568091	21.04737332	RBPJ; TGFBF1
regulation of vascular associated smooth muscle cell apoptotic process (GO:1905459)	0.037667	8.3592552	27.40976932	PDCD4; IGF1
regulation of vascular associated smooth muscle cell differentiation (GO:1905063)	0.037667	8.3592552	27.40976932	PDCD4; PDGFB
regulation of vascular associated smooth muscle cell migration (GO:1904752)	0.101873	4.17853231	9.543905832	MEF2C; PDGFB
regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation (GO:1904705)	0.001267	4.89665932	32.66728123	IL10; CDKN1A; MEF2C; PDGFB; PDCD4; IGF1; MEF2D
regulation of vascular associated smooth muscle contraction (GO:0003056)	0.208774	5.2190919	8.175727717	ATP2B1
regulation of vascular endothelial cell proliferation (GO:1905562)	0.198049	2.61076123	4.227450253	MEF2C; SP1
regulation of vascular endothelial growth factor production (GO:0010574)	0.717828	0.80201145	0.265887312	SULF1
regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0030947)	0.301038	1.89813801	2.278747365	ITGB3; GRB10
regulation of vascular wound healing (GO:0061043)	0.312507	2.98186933	3.468300338	TNFAIP3

regulation of vasculature development (GO:1901342)	0.352067	1.67009858	1.743473092	PLXND1; VASH2
regulation of vasculogenesis (GO:2001212)	0.48099	1.60511698	1.174800806	HIF1AN
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	0.401741	1.49092474	1.359647021	BMPR2; ATP2B1
regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane depolarization (GO:0060373)	0.244981	4.1750547	5.872519063	SCN5A
regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0060307)	0.198049	2.61076123	4.227450253	SCN5A; SCN4B
leukocyte adhesion to vascular endothelial cell (GO:0061756)	0.589414	1.15894724	0.61264967	ROCK1
leukocyte cell-cell adhesion (GO:0007159)	0.134475	2.50789474	5.031789429	ROCK1; CERCAM; MSN
positive regulation of blood coagulation (GO:0030194)	0.549063	1.30395241	0.781774386	THBS1
positive regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043536)	0.021526	2.99277071	11.48780036	MAP3K3; NUS1; SP1; PDGFB; HDAC9; THBS1
positive regulation of cardiac muscle cell differentiation (GO:2000727)	0.279534	3.47902991	4.434482765	MEF2C
positive regulation of cardiac muscle cell proliferation (GO:0060045)	0.003014	8.37541164	48.61417959	TGFBR3; MEF2C; ERBB4; RBPJ
positive regulation of cardiac muscle hypertrophy (GO:0010613)	0.001032	8.06086221	55.43210995	MTPN; EDN1; ROCK1; AKAP6; IGF1
positive regulation of cardiac muscle tissue growth (GO:0055023)	5.33E-06	14.7053965	178.5648225	TGFBR3; EDN1; MEF2C; ERBB4; AKAP6; IGF1; RBPJ
positive regulation of cardioblast differentiation (GO:0051891)	0.208774	5.2190919	8.175727717	TBX5
positive regulation of cardiocyte differentiation (GO:1905209)	0.101873	4.17853231	9.543905832	MEF2C; TBX5
positive regulation of cell migration (GO:0030335)	0.00144	2.0713255	13.55291965	EDN1; BMPR2; INSR; RDX; SEMA4C; PDGFB; SEMA4F; IGF1; ACVR1B; THBS1; TGFBR1; CRKL; IGF1R; COL1A1; PPP3CA; PAK1; CCL7; AKT2; RUFY3; HAS2; ADAM9; HBEGF; MAP4K4; CLASP2
positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0090050)	0.198049	2.61076123	4.227450253	MAP3K3; HDAC9
positive regulation of endothelial cell migration (GO:0010595)	0.042942	2.14932293	6.765861299	NUS1; EDN1; BMPR2; SP1; ITGB3; PDGFB; THBS1; FOXP1
positive regulation of endothelial cell proliferation (GO:0001938)	0.008397	2.778097	13.27902955	NRAS; BMPR2; EGR3; SP1; ITGB3; VASH2; PDGFB; NRARP; TGFBR1
positive regulation of epidermal cell differentiation (GO:0045606)	0.608216	1.09789243	0.545899134	NCOA3
positive regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway (GO:0045742)	0.202351	2.02185908	3.230428022	HIP1; CBL; HBEGF
positive regulation of epidermal growth factor-activated receptor activity (GO:0045741)	0.402653	2.08698031	1.89848669	HBEGF
positive regulation of epithelial cell apoptotic process (GO:1904037)	0.283846	1.98862984	2.504328492	PDCD4; THBS1
positive regulation of epithelial cell migration (GO:0010634)	0.06599	1.94856542	5.296705102	EDN1; BMPR2; ITGB3; ADAM9; THBS1; FOXP1; CLASP2; MAP4K4

positive regulation of epithelial cell proliferation (GO:0050679)	0.010738	2.2715872	10.29923728	YAP1; NRAS; EGR3; BMPR2; ITGB3; VASH2; PDGFB; SOX11; NRARP; IGF1; SCN5A; TGFB1
positive regulation of epithelial to mesenchymal transition (GO:0010718)	0.041639	2.82863083	8.991402991	SMAD2; COL1A1; SMAD4; TGFB1; EZH2
positive regulation of epithelial to mesenchymal transition involved in endocardial cushion formation (GO:1905007)	0.208774	5.2190919	8.175727717	TGFB1
positive regulation of stem cell differentiation (GO:2000738)	0.181225	2.78495801	4.756759337	TBX5; SOX6
positive regulation of stem cell proliferation (GO:2000648)	0.181225	2.78495801	4.756759337	HMGA2; SOX11
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell apoptotic process (GO:1905461)	0.208774	5.2190919	8.175727717	PDCD4
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell migration (GO:1904754)	0.312507	2.98186933	3.468300338	PDGFB
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation (GO:1904707)	0.013975	4.92490476	21.03163879	IL10; PDGFB; IGF1; MEF2D
positive regulation of vascular endothelial cell proliferation (GO:1905564)	0.456089	1.73896791	1.365204984	SP1
positive regulation of vascular endothelial growth factor production (GO:0010575)	0.690085	0.86893691	0.322324141	SULF1
positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0030949)	0.073731	5.22371303	13.61993521	ITGB3; GRB10
positive regulation of vasculature development (GO:1904018)	0.095456	1.7819794	4.18602804	SP1; VASH2; HMGA2; ITGB8; THBS1; HK2; MTDH; HIPK2
positive regulation of vasculogenesis (GO:2001214)	0.373999	2.31898857	2.280731834	HIF1AN
muscle cell development (GO:0055001)	0.190507	2.08936404	3.464307373	DMD; ALPK3; IGF1
muscle cell differentiation (GO:0042692)	0.214361	1.95857319	3.016388326	MEF2C; SEMA4C; DMD
muscle cell fate commitment (GO:0042693)	0.343972	2.60899891	2.784310624	MEF2C
muscle cell migration (GO:0014812)	0.073731	5.22371303	13.61993521	ROCK1; ITGB3
muscle contraction (GO:0006936)	0.238554	1.38237947	1.981172131	GJC1; ACTA1; ROCK1; TPM3; CALD1; TMOD2; DMD; CALM1
muscle filament sliding (GO:0030049)	0.251191	1.79041353	2.473531475	ACTA1; TPM3; DMD
muscle organ development (GO:0007517)	0.016186	2.87721344	11.86450559	MEF2C; EGR3; DMD; IGF1; SOX6; MEF2D; HBEGF
muscle tissue development (GO:0060537)	0.116877	3.79846659	8.153922309	POGLUT1; PTCH1
muscle tissue morphogenesis (GO:0060415)	0.549063	1.30395241	0.781774386	TGFB1

Tabela suplementar 3. Análise da função molecular para o Scaffold endotelizado *versus* controle *in natura* - base de dados GO Molecular Function 2021

Term	P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
vascular endothelial growth factor receptor 2 binding (GO:0043184)	0.312507	2.981869	3.4683	GB3
vascular endothelial growth factor receptor binding (GO:0005172)	0.429996	1.897155	1.601159	GB3
voltage-gated calcium channel activity involved in cardiac muscle cell action potential (GO:0086007)	0.208774	5.219092	8.175728	ACNB2

Tabela suplementar 4. Análise dos miRNA das vias Ontológicas para o *scaffold* endotelizado com musculo liso *versus* controle (*in natura*) – base de dados Jensen TISSUES

Term	P-value	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Vascular cell	0.791696	0.859533	0.680989	0.159063929	MAPK8; THBS1
Vascular smooth muscle	1.33E-04	0.001274	17.52442	156.4704806	HEXIM1; CLCN6; CLCN5; CLCN3; YWHAG
Vascular system	1.13E-09	1.29E-08	2.000423	41.21690062	C5ORF24; UBE2D3; HNRNPU; BZW1; MYLK; IPO5; PPP1CB; CCND1; CDH2; LAMP2; CAST; SLC38A1; MBNL1; FOXP1; TMEM135; HNRNPUL1; TMX1; TBL1XR1; SUB1; MAP1B; PAPP; SRSF2; KCTD12; CGGBP1; ARL8B; STC1; TWF1; LTBP1; CORO1C; UBE2J1; RAP1B; TMEM123; TMEM245; RAP1A; SEC14L1; STK38L; SSR1; RBM12; SLC38A2; SPTBN1; MCL1; NAA50; VAT1; CD164; H3F3B; CAV1; SMARCA5; CRIM1; ARPC5; AZIN1; CAPRIN1; CALU; TCF4; SERINC1; CALM1; EIF4G2; YWHAE; NRP1; CLIC4; TRAM1; BMPR2; CLTC; LAMC1; TRAM2; TMEM47; ACTR1A; XPO1; ENC1; TNPO1; RAB8B; CAP1; ACTR2; PDCD6IP; ENAH; ATRN; ZEB1; ASPH; BCAT1; SGK1; MAPRE1; MAPRE2; RAB1A; MTPN; RALA; SRSF1; GNAI3; THBS1; CDC42; SH3BGR1; MAT2A; SPOCK1; PDLIM5; EIF4B; HNRNPA3; TMEM30A; GALNT1; TXNRD1; NAP1L1; RAB11A; DCBLD2 ; RAB10; UFM1; DLC1; HNRNPA2B1; TRIM37; ATP13A3; TARDBP; CUL4B
Vascular tissue	0.604646	0.758979	0.997858	0.502034194	GOLPH3; AGPS
Vasculature	0.289221	0.65624	1.260514	1.563747089	EFNB2; NRP1; ENTPD1; CXCL12; BMPR2; FZD4; CAV1; PDE5A; IGF1; THBS1
Stria vascularis	0.82262	0.878059	0.581773	0.113597382	HSPA4L
Arterial endothelium	0.339572	0.65624	2.795356	3.019176857	BMPR2
Artery	0.094344	0.364425	1.32674	3.132183463	EDA; IRS1; NPR3; HMGCR; PIK3C2A; PRDM10; MYLK; NR3C2; MAP2; ZIC3; CNR1; LBR; ABCA1; SMAD2; CASR; ARHGEF12; MME; MMD; IGF1; RUNX2; CD2AP; BMP2; CREB1; GDNF; PAPP; KCNMA1; PDE5A; CALM1; FBN1
Aorta	0.925661	0.949238	0.516324	0.039884434	EGLN3; SEC23IP; POGK
Aorta endothelium	1.49E-05	1.50E-04	7.030166	78.11575358	FBN2; CLCN6; CLCN5; SECISBP2L; ARNT; DNAJC13; CLCN3; THBS1; PTPRG; FKBP5
Aortic smooth muscle	0.339572	0.65624	2.795356	3.019176857	KCNMA1
Aortic valve	0.532655	0.717985	1.397303	0.88013402	GLS

					ATF2; C5ORF24; GMFB; MAML1; WIPF2; HNRNPU; RBPJ; FNBP1L; DCAF7; GLS; SMC2;G PBP1; STMN1; BBX; SAMD12; PRKACB; MEF2C; MBNL1; RBFOX2;M BNL2; DICER1;G APVD1; ATG12; EML4; ZC3H11A; TBPL1; LETMD1; CGGBP1; SKAP2; PRR13; MTMR3; CTBP2; CEP85L; BAZ2A; BAZ2B; ZC3HAV1; ZNF24; ARPP19; MTDH; PRKAR2A; SSR1; ZNF148; HEXIM1; NAA50; CDK19; H3F3B; EDEM1; NFATC3; MEX3C; FLI1; CYLD; PKIA; PHF20; CLTC; OSBPL11; CYB561D1; PHF6; GLI3; NIPBL; MED13; UBL3; WDR37; TET2; SIRT1; FAM222B; ZEB2; AEBP2; TMEM33; TET3; PIGK; PELI1; VAMP1; RAPGEF2; VAMP2; PAFAH1B1; GAS7; RNF165; WDR26; DLST; GGA2; BTAF1; C18ORF25; SNX27; RICTOR; SRSF10; SF3A3; PCGF5; MBD2; HIPK1; BLCAP; GATAD2B; HIPK2; NUDT21; ERP44; RYBP; TAOK1; SERBP1; PKN2; ZNF451; DGKE; CSF1; FMR1; UBE2D3; CASC4; IRS2; IL1RAP; FRY; LCLAT1; BZW1; IPO7; IPO5; PPP1CB; RIMS1; SESN1; LAMP2; KPNA6; SLC16A6; PAPOLA; ZNF326; PLXNC1; KPNA1; MAP3K5; SH3GLB1; KCMF1; BNIP3L; SLC38A1; RNF44; KHNYN; TPM3; ZBTB38; UBE2E3; DYRK1A; PRPF4B; LARP4B; FBXW2; FOXF1; FRMD5; RALGAPB; SLC9A6; SRSF2; SREK1; IL6ST; SRSF7; ARL8B; FKBP5; NOTCH2; CBFB; CUL5; PEF1; TNKS; ABHD2; CUL3; CREM; CREBL2; LIN7C; FOXO1; CORO1C; RAP1B; SBNO1; ATXN1; RAP1A; KDSR; SLC38A2; MCL1; ANKRD28; AKIRIN2; CD164; OSBPL8; CEP350; ARPC5; FOXN3; QKI; CNOT6; SON; CDK6; NBEA; CNOT1; CNOT2; CPD; DMXL2; MDM4; SERINC1; OGT; ZNF652; EIF4G2; BNC2; CELF1; CELF2; ITGB3; PTEN; FAM208A; ZC3H6; PIK3C2A; PPP6C; PPP6R3; TLK2; TLK1; ATP7A; TNPO1; YAF2; ARL5A; LBR; ACTR2; PDCD6IP; APAF1; SECISBP2L; ATRX; VEZF1; WIPI2; SMC1A; RAD23B; MSL1; PTBP3; ATRN; BIRC6; ETF1; SOS2; CRK; PPP1R15B; RAB1A; MTPN; SLC24A4; ROCK1; LUZP1; SRSF1; RNF38; ZBTB44; PPM1K; NSL1; CDC42; DNAJB1; ZNRF2; UBQLN1; E2F3; SH2B3; WASF2; DCAF12; EIF4B; TRIM44; KCNJ2; HNRNPA3; MYO10; TXNRD1; FOXJ3; PLCL2; KIAA0232; RPRD2; KLF3; RAB10; SNRK; MARCKS; NIN; RAB14; VAPB; EIF3J; PDCD4; TRIM37; SNRNP48; BCOR; SLC25A36; TNRC6A; CUL4B; TNRC6B; LPGAT1; PITPNA; CCNC; GCC2; HS6ST2; IFIT2; PNN; RPS6KA3; RASSF2; KIF21A; ARFIP1; SEC62; ATXN7L3; SOX4; AGFG1; ENTPD1; SMARCC1; SCAF11; ACSL1; SACM1L; ACSL4; RUNX1; UHMK1; CHIT1; CCNY; SUB1; KCTD12; CASZ1; FOXG1; SDC2; PIK3R1; RTF1; ZBTB4; UBE2J1; TGOLN2; FXR1; SNX1; SEC14L1; ZNF704; ST8SIA4; HIVEP2; RBM12; SPTBN1; SRPK2; VAT1; SLC10A7; BCL11B; BCL11A; SIAH1; SMARCA5; BSDC1; SUCO; AMMECR1; SMARCA2; PUM2; SRPK1; CALU; TMCC1; CALM1; RCOR1; CLIC4; TRAM1; FAF2; OLA1; BMI1; SYNCRIP; AKAP13; ACTR1A;
Blood	6.55E-13	8.71E-12	1.525552	42.79700402	

					PPP3CB; AKAP11; ZMYM2; XPO1; SPTLC2; ENC1; DHX15; KIF1B; TMED5; NDEL1; RAB8B; NCOA1; CAP1; CDV3; MME; MMD; NCOA3; TSC22D2; NME4; CCDC117; CBFA2T3; ZDHHC17; MTSS1; RAP2C; RAP2B; KIF2A; CD47; SGK1; MAPRE1; MAPRE2; VGLL4; DCP2; STX12; CAB39; GNAI3; NEDD9; AKAP2; TRAK2; PURA; SH3BGR1; MNT; PAK1; SERTAD2; SHOC2; TBL1X; SPTSSA; EPS15; PAK2; MPZL1; MAP4K4; RANBP2; SUZ12; MAP3K3; MON2; MAP3K1; FAM46C; DMRT2; FAM46A; KLHL2; XPO7; LHFPL2; RAB11A; MIB1; RIT1; DPY19L4; HNRNPA2B1; KBTBD2; TARDBP; MEGF9; OTUD4; NRK; POGK; ZFAND5; UBE3A; NUCKS1; ARID4B; NR3C1; ETS1; IGF1R; CCND2; RGS3; KIF5C; POGZ; CAST; KDM2A; MGMT1; CASK; UBE4A; TSC1; SUPT7L; RSN1; PDIA4; HNRNPUL1; TMX1; TBL1XR1; CMPK1; ATP6V1A; UBA6; YTHDC1; SEL1L; PDS5A; S TK4; ZFP36L2; SEL1L3; TMEM123; CAMTA1; TBC1D15; SMAD2; SMAD4; CPSF6; MSN; SSH2; AZIN1; LIN28B; PAN3; CAPRIN1; GNB1; UBE2N; TCF4; MXD1; GRSF1; UBE2K; BRWD3; PICALM; DDX3Y; YWHAE; RBM25; DDX3X; DOCK3; USP32; ADAR; CHD2; AFF4; AFF1; LASP1; SPRED1; ZC3H7A; PPP2R5E; PDE4B; LRRFIP1; MYBL1; MAPK1IP1L; USP47; TBC1D9; PPP2R5C; ARID1A; YWHAZ; TGFB3; CREB1; ELF2; UBE2R2; IRF2; RBMS1; LUC7L3; MS4A1; SHANK2; CREB5; RALA; C2ORF69; ASAP1; HMGCR; CLCN3; NR2C2; THBS1; TNKS2; MAT2A; LEPROTL1; MAPK1; PDLIM5; ARFGEF1; TTC14; TMEM30A; WTAP; GALNT1; CMTM6; ZNF181; ATP2B4; NAP1L1; ATP2B1; ACVR2A; U2SURP; GALC; GOLPH3; UFM1; PIKFYVE; KRAS; ATP13A3; LPIN2
Blood clot	0.987252	0.990932	0.224743	0.00288343	ITGB3
Blood plasma	0.999992	0.999992	0.07914	6.64E-07	HTR2C
Blood platelet	2.36E-14	3.58E-13	1.575957	49.4514607	GMFB;ITSN1;HNRNPU;ADARB1;FNBPI1L;DC AF7;MYLK;GLS;AKT3;FAM110B;MYB;STM N1;ANKFY1;DIP2A;PRKACB;PRKAB2;MBNL 1;MBNL2;GLCE;PRKCE;SOX11;DICER1;AR MC8;GAPVD1;DKK2;CD2AP;EML4;DYNC1LI 2;RFX7;PRKD3;ZC3H11A;HECW2;MAP1B;SK AP2;CTBP2;HSPA4L;MTMR9;BAZ2B;ZC3HA V1;ARPP19;MTDH;FAM160B1;RIC8B;EPB41 L1;PRKAR2A;SSR1;CDK17;NAA50;CDK19;S TARD13;H3F3B;NEBL;RDX;ERLIN1;ERLIN2; VANG1L;CYLD;GPR180;CDK14;FERMT2;W DR47;PHF20;CLTC;LPCAT1;MECP2;UBL3;W DR37;EXOC8;NIPA1;ASH1L;PGM2L1;WDR33 ;PHF20L1;TMEM33;PAX7;PLSCR4;AGPS;VA MP1;RAPGEF2;EXOC5;C5ORF51;VAMP2;PA FAH1B2;PAFAH1B1;ARF6;GAS7;WDR26;PR UNE2;KCNA3;DLST;SNX30;GGA2;NRAS;SN X27;PRR14L;NSD1;RICTOR;DMD;MBNL3;SF 3A3;AGK;NUDT21;ERP44;ABI2;TAOK1;SER BP1;CCDC6;PKN2;NAB1;FMR1;UBE2D3;FBX O28;FAM13A;RORA;IRS2;FRY;LCLAT1;BZW 1;IPO7;IPO5;PPP1CB;IPO9;SESN3;CDH2;SLC 39A9;CFL2;LAMP2;KPNA6;PLXNC1;PCDHA

C2;KPNA1;MAP3K5;SH3GLB1;KCMF1;TPD52;CSNK1G3;DYRK1A;ATP11C;ATP11A;RAB30;SRSF2;IL6ST;SRSF7;ARL8B;FKBP5;CSNK1G1;INO80D;CBFB;CUL5;PEF1;TNKS;CUL3;ANKRD12;CREM;ITPR2;LIN7C;CORO1C;RAP1B;CTIF;RAP1A;PLXNA2;NPTX1;PLXNA4;ANKRD28;OSBPL8;TIA1;BTBD7;ARPC5;C6ORF120;CNOT4;MOB1B;CXCL12;CDK6;NBEA;SYNJ1;CNOT1;BCL2;EIF4G3;EIF4G2;SFT2D3;BMPR2;CELFL1;CELFL2;PTEN;ZC3H6;PPP6C;AP1G1;PPP6R3;TLK2;ITGB8;PHACTR2;TLK1;HIF1AN;ATP7A;TNPO1;ARL5A;LBR;ACTR2;PDCD6IP;APAF1;DST;VPS13D;WIP1;RAD23B;PTBP2;MSL1;PTBP3;ASPH;IL1RAPL1;ETF1;BCAT1;SOS2;CRK;CERS2;HDAC4;RAB1A;MTPN;ROCK1;SRSF1;LRP2;ZBTB41;CDC42;AP3M1;DNAJB1;ZNRF2;ELMSAN1;IGF2BP1;UBQLN1;VPS54;XIRP2;ASCC3;FNIP1;WASF2;EIF4B;HNRNPA3;MYO10;TXNRD1;SEPT14;RAB10;NIN;VAPA;RAB14;VAPB;SYT10;TSPAN18;EIF3J;PDCD4;RAB18;SMAP1;RECK;CUL4B;LPGAT1;PITPNA;GCC2;CRKL;RPS6KA3;GOLGA4;BCAP29;ARFIP1;SEC62;AGFG1;EPHA7;SCAF11;ACSL1;SACM1L;GOLPH3L;ANK2;YOD1;ACSL4;CCNY;XRN1;SUB1;AKAP9;KCTD12;PFN2;STXBP1;EIF5A2;TWF1;PIK3R1;NLK;KALRN;MED12L;UBE2J1;TGOLN2;FXR1;SNX1;NUAK1;MIER3;STK38L;STXBP5;RBM12;SPTBN1;VAT1;YES1;MICAL3;SMARCA5;BSDC1;MYO5A;PTK2;PUM2;ICK;CCDC88A;CALU;RANBP10;TMCC1;CALM1;CLIC4;TRAM1;FAF2;AP4E1;OLA1;PTPRJ;PTPRK;WASL;PTPRF;RAB22A;SYNCRIP;AKAP13;ACTR1A;PPP3CB;SH3PXD2A;XPO4;REV3L;UBXN7;KIF1B;TMED5;RAB8B;CAP1;CDV3;TSC22D2;NME4;ZHX1;MTSS1;ENAH;RAP2C;RAP2B;ALDH5A1;KIF2A;ZADH2;KIT;PITPNM2;CD47;MAPRE1;MAPRE2;STX12;CAB39;STX16;GNAI3;AKAP6;TRAK1;PURB;PURA;SH3BGR1;PAK1;SHOC2;MAP4K5;EPS15;PAK2;MAP4K4;RANBP2;MAP3K3;MON2;MAP3K1;SORT1;FAM46C;KLHL2;XPO7;LHFPL2;RAB11A;MPP7;SEC23IP;RIT1;HNRNPA2B1;TARDBP;GALNT13;POGK;UBE3A;PRDM2;RGS3;KIF5C;SH3GL2;CAST;TMOD1;PDGFRA;MMGT1;TMOD3;TMOD2;CASK;UBE4A;RPGRI1L;PDIA4;TMX1;GPD2;EOGT;CMPK1;WDFY3;ATP6V1A;DDX6;UBA6;SEL1L;PDS5B;STK4;LPP;LTBP1;EFNB2;VCP1P1;TMEM123;TMEM245;TBC1D15;SMAD2;TGFB2;AUTS2;MSN;ARHGAP28;DNAJC13;SMAD5;DNAJC16;LRP1B;GCLC;DLG1;CAPRIN1;GNB1;UBE2N;UBE2K;GALK2;PICAM;FBN1;DDX3Y;YWHAH;RBM25;DDX3X;DOCK3;ELAVL4;LAMC1;PPP1R9A;AFF3;ELAVL2;HS2ST1;SEPT8;LASP1;MFSD6;GRM7;PPP2R5E;TRPS1;DBT;LRRFIP1;MYBL1;YWHAH;MKL2;MAPK1IP1L;USP47;ARHGEF12;ABCC5;NAV2;PPP2R5C;YWHAZ;DNM3;CREB1;PEAK1;SPOPL;LUC7L3;PDE5A;RBM24;RALA;GOSR1;ASAP1;CBL;CLCN3;THBS1;GNA13;CANND1;MAT2A;PRRG1;NAA25;REPS2;MAPK1;PDLIM5;CLASP2;ARFGEF1;USP24;TMEM30A;GALNT1;CMTM6;ATP2B4;ATP2B3;NAP1L1;ATP2B1;FMNL3;CLCN5;GOLPH3;UFM1;PIKFYVE;RPS6KB1;KRAS;NAA15;SNTB2

Blood vessel endothelium	0.5923 3	0.747898	0.963232	0.50443708 7	SMAD2;ABCA1;BMP2;IGF1;HMGCR;CALM1; MYLK;CD2AP
Bloodstream form	0.4352 49	0.687855	1.270613	1.05694232 8	GOLPH3;PIGK;RAB11A
					USP6NL;ATF2;C5ORF24;CHIC1;PGAP1;GMF B;ITSN1;RBPJ;MYLK;ZC3H12C;ZFYVE26;GP BP1;AKT3;FAM110B;ANKFY1;BBX;SAMD12 ;PRKACB;PRKAB2;MEF2C;RBF2C;FRS2;DI CER1;GAPVD1;CD2AP;EML4;RFX7;ZC3H11 A;RUFY3;RUFY2;TBPL1;LETMD1;CLOCK;C GGBP1;SKAP2;ZNF275;ZBTB8A;MTMR3;CE P85L;MTMR9;BAZ2A;BAZ2B;ZC3HAV1;MT MR4;ZNF24;SLC5A3;EPB41L1;PRKAR2A;PP ARGC1A;HEXIM1;ABCA1;EDEM3;CADM1;C ADM2;NEBL;EDEM1;PBX3;ERLIN1;ERLIN2; FLI1;VANG1;MLLT10;FAM135A;PKIA;FER MT2;KCNC2;BHLHE41;SNX13;ARHGAP5;OS BPL11;MECP2;TMEM47;NIPBL;MED13;ZNF2 48;SS18;CNOT6L;NIPA1;SLC39A10;ELOVL6; CCSAP;SIRT1;DYNLL2;DIEXF;PHF20L1;FA M222B;MMP16;TMEM33;PLSCR4;KCNMA1;P XDN;AGPS;PIGK;PELI1;VAMP1;RAPGEF2;T MEM106B;C5ORF51;CACUL1;VAMP2;PAFA H1B2;PAFAH1B1;ARF6;SAMD8;STAU2;KCN A1;DLST;SNX30;SLC7A2;FAM117B;GGA2;N RAS;BTAF1;C18ORF25;SNX27;PLAGL2;RICT OR;DMD;MEF2D;SRSF10;EGLN3;ANKIB1;M BD2;C20ORF194;GATAD2B;DCBLD2;NUDT2 1;SNX16;ETNK1;TAOK1;SERBP1;CCDC6;PK N2;LGR4;C11ORF57;YPEL2;ZNF451;CCNT2; TMEM167A;NAB1;FBXO28;FAM13A;CASC4; RORA;IL1RAP;FRY;PTAR1;SESN3;SESN1;KP NA6;SLC16A6;SYBU;KPNA1;MAP3K5;SH3G LB1;BNIP3L;ZBTB39;SLC38A1;KHNYN;ZBT B38;UBE2E3;CTNNBIP1;ATP11C;PRPF4B;ZB TB34;ATP11A;FOXP2;FBXW2;FOXPI;FRMD5 ;MAF;TXLNA;SLC9A6;SRSF2;ZNF436;ROR1; IL6ST;SRSF7;ARL8B;PFKFB2;INO80D;PEF1; CREM;SPATA2;CREBL2;UBFD1;LIN7C;FOX O1;CORO1C;RAP1B;CTIF;SBNO1;ATXN1;RA P1A;KIAA1522;KDSR;SOCS6;SLC38A2;SOCS 4;SOCS5;TIA1;STYX;ZBTB10;ARPC5;FOXN3; FBXO33;QKI;PTPRD;CXCL12;SON;SP1;DMX L2;AAK1;MDM4;ZNF654;OGT;ZNF652;CELF 1;CELF2;PTEN;HTR2C;FAM208A;NRARP;KI AA1549;PPP6R3;ITGB8;ZNF644;ATP7A;YAF2 ;ARL5A;ACTR2;APAF1;DST;VPS13D;ATRX; ARNT;VEZF1;RAD23B;MSL1;ATRN;IL1RAP L1;LCOR;BIRC6;ETF1;SMCR8;PPP1R12B;CE RS2;PPP1R15B;ROCK1;SRSF1;PPM1H;ATP10 B;ZBTB44;PPM1K;LRP2;MLLT3;ZBTB41;LRP 6;CDC42;ZNR2;PARD6B;ZNR2;ELMSAN1; TP53INP1;IGF2BP1;UBQLN1;BEND4;E2F3;SH 2B3;EIF4B;TRIM44;KCNJ2;NTRK2;HNRNPA3 ;PRRX1;MYO10;PCDH7;MGA;FOXJ3;KIAA02 32;SEPT14;SNRK;NOVA1;ST5;SYT10;TSPAN 18;TSPAN17;EIF3J;PDCD4;TRIM37;SMAP1;R ECK;SLC25A36;PTPN3;SLC23A2;CCNJ;LPGA T1;CCP110;CCNC;GCC2;IKZF2;CRKL;RASSF 2;BCAP29;KIF21A;ATXN7L1;SEC62;ATXN7L 3;SCN1A;ARL10;EPHA4;ENTPD1;EPHA7;SM ARCC1;SCAF11;GOLPH3L;ANK2;TMEM170B ;CCNY;SUB1;ALPK3;KCTD12;ZNF710;TRIB2 ;KCTD15;SDC2;PIK3R1;RTF1;PCDH19;ZBTB 5;ZBTB4;KALRN;CDKN2AIP;PCDH17;MED1 2L;UBE2J1;TGOLN2;MBTD1;SNX1;SEC14L1;
Cardiac muscle	1.95E- 32	7.51E-31	2.514434	183.587842 1	

MIER3;ZNF704;HLTF;ST8SIA4;STK38L;HIVE
P2;RBM12;RIMKLB;SCN3A;YES1;SLC10A7;S
MARCA5;BSDC1;MYO5A;RASSF8;SUCC1;IGF
1;HSPA12A;SMARCA2;DCLK1;PTK2;ICK;PE
X5L;WNK3;CALU;ID4;RANBP10;INTS6;CAL
M1;RCOR3;RGL1;RCOR1;PTPRT;NRP1;CSRNP
P2;NRP2;CSRNP3;CCDC126;AP4E1;OTUD7B;
PTPRJ;PTPRK;GRIK2;WASL;BMI1;PTPRF;RA
B22A;PTPRG;SYNCRIP;AKAP13;ACTR1A;PP
P3CB;AKAP11;SPTLC2;ENC1;DHX15;REV3L;
KIF1B;NDEL1;NCOA1;CAP1;MME;MMD;NC
OA3;SORCS1;CCDC117;ZHX1;CNKSR2;ENA
H;RAP2C;RAP2B;KIF2A;PDIK1L;ZADH2;KIT;
PITPNM2;GLCCI1;CD47;STX12;FOXC1;CAB3
9;STX16;GNAI3;NEDD9;XIAP;TXLNG;SH3B
GRL;MNT;PAK1;SERTAD2;EPS15;PAK2;MA
P3K2;MAP3K3;GABBR2;MON2;MAP3K1;SO
RT1;KLHL2;MIB1;SEC23IP;RIT1;DPY19L4;H
NRNPA2B1;TARDBP;OTUD4;PCDH11Y;ZFA
ND5;WWC2;GXYLT1;UBE3A;PRDM2;PRDM
1;NR3C1;ETS1;IGF1R;NR3C2;ZNF81;CCND2;
AMMECR1L;RGS3;CCND1;KIF5C;SH3GL2;C
AST;TMOD1;PDGFRA;MMGT1;TMOD3;TMO
D2;CASK;UBE4A;RPGRIPI1L;SUPT7L;TANC2
;HNRNPUL1;TMX1;GPD2;ADAM12;WDFY3;
DENND6A;FBN2;KLHL18;DDX6;KLHL15;UB
A6;YTHDC1;SLC1A1;NPR3;SEL1L;PDS5B;PD
SSA;VCPIP1;TMEM245;KIF3B;CAMTA1;TBC
1D12;NXPH1;TBC1D15;QSER1;TFAP2A;ZFH
X3;SYT1;AUTS2;CAV2;CAV1;KLHL28;CRIM
1;MSN;HMGA2;SSH2;ZFHX4;UBE2W;GCLC;
PAN3;APBP2;HOOK1;GNB1;UBE2N;TAB3;T
CF4;MXD1;UBE2K;DNAL1;GALK2;PICALM;
FBN1;DDX3Y;YWHAE;PHTF2;RBM25;DYRK
2;EDA;DDX3X;CHD9;CHD7;ADAR;LAMC1;P
PP1R9A;CHD2;AFF3;SOBP;AFF4;AFF1;GRM1
;AFF2;LASP1;GRM7;MAN1A2;ZIC3;LRRFIP1;
MYBL1;YWHAG;RBM33;MKL2;NAA30;ARH
GEF12;TGIF2;TBC1D9;NAV1;ETV1;NAV2;Y
WHAZ;CREB1;ELF2;UBE2R2;NAV3;ALS2;IR
F2;SPOPL;RBM24;MS4A1;CREB5;RALA;GOS
R1;ASAP1;HMGCR;CBL;CLCN3;ATAD2B;PR
TG;CAND1;SH3TC2;TNKS2;MAT2A;CNR1;N
AA25;SPOCK1;PDLIM5;TRDMT1;ARFGEF1;T
TC14;EYA1;GALNT1;EYA4;ATP2B4;ATP2B1;
ACVR2B;ACVR2A;U2SURP;GALC;CLCN6;G
OLPH3;UFM1;KATNB1L;KRAS;NAA15;SNTB
2;EHF;MAML1;MYT1L;WIPF2;RAPH1;HNRN
PU;ADARB1;FNBP1L;DCAF5;SLC4A4;BACH
2;DCAF7;GLS;SMC2;ELK4;HOXA9;ZXDB;M
YB;STMN1;DIP2A;MED1;MBNL1;MBNL2;GL
CE;PRKCE;FNDC3B;AFAP1;SOX11;FNDC3A;
ARMC8;ATG14;DKK2;ATG12;CPED1;DYNC1
LI2;PRKD3;HECW2;MAP1B;MAML3;PRR13;
ZNF395;SEH1L;CTBP2;HSPA4L;NEDD4L;C9
ORF72;ARPP19;PRDM10;MTDH;FAM160B1;R
IC8B;SSR1;ZNF148;RREB1;CDK17;NAA50;C
DK19;FZD3;NDFIP2;STARD13;FZD4;RDX;NF
ATC3;MEX3C;PHC3;ELL2;GPR137C;CYLD;Z
NF37A;GPR180;CPEB3;CPEB2;CDK14;CPEB4
;GABRB3;ZNF131;WDR47;PHF20;CLTC;LPC
AT1;CYB561D1;PHF6;GLI3;C16ORF72;UBL3;
TRIM2;ZNF280C;JARID2;ZNF367;TEAD1;RR
P15;ZNF362;WDR37;EXOC8;SLC2A13;TCF12;
TET2;ASH1L;FAM126B;WDR33;BACE1;ZEB2
;ZEB1;AEBP2;TET3;RARB;ANGPTL2;EXOC5;

PLCB1;GAS7;RNF165;WDR26;CTDP1;RNMT;
PRUNE2;FIGN;ADCY1;FGD6;NSD1;UBN2;A
NKRD52;TAF9B;MBNL3;RUNX1T1;SF3A3;F
ARP1;PCGF5;AGK;PCGF3;C1ORF21;SULF1;H
IPK1;BLCAP;FAM104A;HIPK3;HIPK2;ERP44;
RYBP;NFIA;ABI2;NFIB;RFWD3;RLIM;DGKE;
CSF1;IRS1;FMR1;IRS2;FGF1;LCLAT1;BZW1;I
PO7;CDC14A;SLC8A2;IPO5;PPP1CB;IPO8;FG
F7;RIMS4;IPO9;CDH2;SLC39A9;CFL2;PAPOL
G;LAMP2;GRB10;PAPOLA;ZNF326;SLC39A8;
PLXNC1;PCDHAC2;KCMF1;MAGI1;TPD52;C
SNK1G3;RNF44;USP6;IGFBP5;PPTC7;TPM3;S
EMA6D;MAGI2;DIO2;DYRK1A;LARP4B;ST7
L;HIC2;RAB30;RALGAPB;CACNB4;KAT6B;S
REK1;TTPAL;FKBP5;CSNK1G1;NOTCH2;SL
C26A2;CBFB;CUL5;TNKS;ABHD2;CUL3;AN
KRD12;ITPR2;ITPRIPL2;NEUROD1;HMBOX1
;BTBD3;PLXNA2;ABL2;SRGAP3;SRGAP2;PL
XNA4;MCL1;ANKRD28;AKIRIN2;CD164;OSB
PL8;CEP350;BTBD7;ESRRG;C6ORF120;CNOT
4;REEP1;MOB1B;CNOT6;CDK6;NBEA;SYNJ1
;CNOT1;CNOT2;MAFG;CPD;BCL2;SERINC1;
EIF4G3;ZNF532;BCL2L2;EIF4G2;EIF4E3;BMP
R2;BNC2;ZC3H6;PIK3C2A;PPP6C;ADAMTS5;
SGCD;AP1G1;PSD3;TLK2;PHACTR2;TLK1;HI
F1AN;TNPO1;LBR;ADAMTS6;PHACTR4;PDC
D6IP;SECISBP2L;WIPI2;SMC1A;ADRA2B;PT
BP2;PTBP3;ASPH;TRAF3;DNAJC6;PAPD5;LC
ORL;SOS2;CRK;HDAC4;RAB1A;NFAT5;MTP
N;NUFIP2;LUZP1;PLAG1;SEMA3A;RNF38;T
ULP4;NSL1;AP3M1;STOX2;DNAJB1;HECTD2
;ZNF507;RSBN1L;NHS;VPS54;XIRP2;ASCC3;
FNIP1;RFFL;WASF2;DCAF12;JAZF1;RNGTT;
TXNRD1;PLCL2;RPRD2;KLF3;TNRC6C;RAB
10;KLF7;MARCKS;NIN;VAPA;RAB14;VAPB;
MGAT4A;PII5;RAB18;SNRNP48;BCOR;TNRC
6A;CUL4B;PANK3;PITPNA;DIXDC1;IFIT2;PN
N;RPS6KA3;GOLGA4;ARFIP1;SOX6;SOX4;A
GFG1;SOX5;ACSL1;SACM1L;MTUS1;EBF3;Y
OD1;ACSL4;RUNX1;UHMK1;CHIT1;XRN1;P
APPA;AKAP9;ZFPM2;PFN2;GPM6A;CASZ1;I
GSF3;STXBP1;DCUN1D3;EIF5A2;DCUN1D4;
STC1;TWf1;NLK;FXR1;NUAK1;MAP2;STC2;
GSE1;STXBP5;GPM6B;SPTBN1;SRPK2;VAT1
;NUS1;DTNA;BCL11A;SIAH1;GDF6;PUM2;SR
PK1;CCDC88A;SESTD1;CREBRF;TMCC1;RO
BO2;TENM1;TENM2;CLIC4;TRAM1;FAF2;OL
A1;TRAM2;ZCCHC14;ROBO1;EPB41L4B;ZM
YM2;XPO1;SH3PXD2A;XPO4;UBXN7;GABP
A;TMED5;RALGPS2;RAB8B;CDV3;HEG1;TS
C22D2;CBFA2T3;ZDHHC17;MTSS1;ALDH5A
1;TFEC;SGK1;MAPRE1;MAPRE2;VGLL4;DCP
2;AKAP6;ZDHHC21;TRAK1;AKAP2;TRAK2;P
URB;PURA;CUX2;METTL4;SHOC2;TBL1X;S
PTSSA;MAP4K5;MPZL1;MAP4K4;RANBP2;S
UZ12;FAM46C;DMRT2;SLC31A1;MTX3;FAM
46A;XPO7;LHFPL2;RAB11A;MPP7;DLC1;KB
TBD2;KBTBD8;MEGF9;GALNT13;NRK;POG
K;ARID4A;NUCKS1;AMOT;POGZ;KDM2A;K
DM2B;TSC1;LIFR;RSBN1;PDIA4;TMEM135;T
BL1XR1;COL4A4;COL4A3;EOGT;CMPK1;ST
EAP2;ATP6V1A;STK4;LPP;LTBP1;ZFP36L2;A
RHGAP12;SEL1L3;CAMSAP2;EFNB2;TMEM1
23;ARHGAP20;PODXL;BPTF;MARK1;KLHD
C10;SMAD2;TGFB2;SMAD4;CPSF6;POU2F1;
ARHGAP28;DNAJC13;HELZ;SMAD5;ESR1;D

					NAJC16;AZIN1;DIAPH2;DLG1;PLCXD3;LIN28A;NR4A3;DLG2;GDNF;CAPRIN1;BRWD1;GRSF1;ZCCHC3;BRWD3;ZCCHC2;CREBZF;DOCK3;THRB;USP31;USP32;SOWAHC;CTDSPL2;HS2ST1;SEPT8;MFSD6;SPRED1;ZC3H7A;SIX4;PPP2R5E;TRPS1;DBT;LRRTM2;PDE4B;MAPK1IP1L;USP47;KLF12;DCC;ABCC5;PPP2R5C;ARID1A;TGFB1;IQCH;TGFB3;PALLD;PEAK1;RBMS1;LUC7L3;PDE5A;C2ORF69;NRXN1;TOB2;NR2C2;THBS1;GNA13;FAM168B;MAPK8;ERBB3;ERBB4;LEPROTL1;PRRG1;REPS2;MAPK1;NCAM1;S100BP;CLASP2;USP24;TMEM30A;WTAP;NEGR1;CMTM4;CMTM6;LG12;ZNF181;SPRY4;NAP1L1;MEIS2;FMNL3;SLC4A7;SLC4A8;MEIS1;PIKFYVE;WEE1;RPS6KB1;PDE7B;ATP13A3;PDE7A;LPIN2;HCN1
Coronary artery	0.865526	0.9059	0.498555	0.072000516	DCBLD2
Embryonic fibroblast	0.233729	0.65624	1.399398	2.03415294	MAPK8; LIN28A; CCND1; APAF1; KDM2B; PTEN; MDM4; SIRT1
Embryonic stem cell	0.834484	0.887205	0.558472	0.101050968	ITSN1
Endothelial cell	0.305365	0.65624	1.398497	1.658963222	WDR26; FGD6; LAMC1; ATP7A; THBS1
Human aortic endothelial cell	0.264847	0.65624	2.150963	2.85777852	MAPK8; CADM1
					EHF; HNRNPU; CCNC; GCC2; RBPI; FNBPI1; DCAF7; MYLK; PNN; RPS6KA3; GOLGA4; RASSF2; GPBP1; STMN1; SEC62; PRKACB; MEF2C; MBNL1; SMARCC1; RBFOX2; MBNL2; ACSL1; AFAP1; ANK2; DICER1; FNDC3A; UHMK1; CPED1; DYNC1LI2; ZC3H11A; SUB1; ALPK3; CLOCK; CGGBP1;SKAP2;PFN2;BAZ2A;BAZ2B;RTF1; ZNF24;ARPP19;TGOLN2;FXR1;SNX1;MAP2;STC2;STK38L;SSR1;RBM12;ZNF148;RIMKLB; SPTBN1;NAA50;H3F3B;RDX;SMARCA5;BSDC1;SRPK1;PKIA;CALU;CALM1;CPEB4;NRP1; CLIC4;TRAM1;CLTC;FAF2;SNX13;WASL;PTPRF;AKAP13;ACTR1A;PPP3CB;AKAP11;XPO1;ENC1;DHX15;REV3L;KIF1B;RAB8B;NCOA1;TCF12;ZEB1;TMEM106B;CD47;SGK1;CACUL1;WDR26;STAU2;ZDHHC21;SNX27;DMD; SHOC2;SRSF10;PAK2;MAP3K2;C1ORF21;SULF1;BLCAP;MIB1;HIPK2;NUDT21;ABI2;SERBP1;OTUD4;TMEM167A;UBE2D3;ZFAND5;RORA;UBE3A;NUCKS1;BZW1;IPO5;PPP1CB;CND2;CFL2;PAPOLA;KPNA1;SH3GLB1;CAST;BNIP3L;SLC38A1;IGFBP5;TPM3;UBE4A;LIFR;HNRNPUL1;TBL1XR1;GPD2;CMPK1;IL6ST;SRSF7;STEAP2;FKBP5;KLHL18;SEL1L;SLC1A2;LPP;NEUROD1;PODXL;PLXNA2;ABL2;SLC38A2;CD164;SMAD4;CPSF6;CAV1;MSN;FOXN3;ZFXH4;SMAD5;QKI;AZIN1;SON;CNOT1;CAPRIN1;GNB1;SERINC1;BRWD1;UBE2K;EIF4G2;FBN1;YWHAE;RBM25;BMPR2;CHD9;CHD7;LAMC1;PIK3C2A;PSD3;TNPO1;MAPK1IP1L;ACTR2;ARHGEF12;PDCD6IP;DST;ATRX;ARID1A;RAD23B;ATRN;ASPH;PEAK1;PPP1R12B;RBM24;NFAT5;MTPN;NUFIP2;ASAP1;ZBTB44;THBS1;CDC42;AP3M1;DNAJB1;FAM168B;MAT2A;XIRP2;NCAM1;PDLIM5;EIF4B;TTC14;HNRNPA3;CMTM6;ATP2B4;NAP1L
Muscle	1.40E-16	2.48E-15	1.997223	72.90354113	

					1;U2SURP;RAB10;SLC4A7;VAPA;EIF3J;TRIM37;BCOR;ATP13A3;PTPN3;CUL4B
Muscle stem cell	0.074058	0.31839	3.498125	9.105303882	PAX7; DMD; IGF1
Myoblast	1.08E-07	1.15E-06	4.284323	68.71479031	CAST; HDAC4; MBNL1; MEF2C; IGFBP5; IRS1; CELF1; IGF1; ACVR2B; RUNX2; FOXO1; IGF1R; BMP2; MAPK8; CCND1; CDH2; RPS6KB1; PAX7; ADAM12; DMD; PPARGC1A; RBM24; MEF2D
Myocardium	0.532655	0.717985	1.397303	0.88013402	GLS
Myoepithelium	0.124995	0.44576	2.238919	4.655793755	MME; PLAG1; KIT; ESR1
Myofibroblast	0.119763	0.428521	1.697517	3.602537395	SMAD2; TGFB2; CXCL12; CDH2; TPM3; CLTC; KIT; TGFB1
Peripheral blood	0.311239	0.65624	1.271632	1.48424171	AP3M1; NR4A3; APAF1; CEP85L; DLST; TSC1; VAMP2; RUNX1
Peripheral blood stem cell	0.437494	0.687855	1.397601	1.155387049	TET2; NCAM1
Smooth muscle	2.03E-16	3.42E-15	1.591833	57.5171902	USP6NL; ATF2; MYLK; ZC3H12C; GPBP1; AKT3; FAM110B; ANKFY1; BBX;PRKACB;PRKAB2;MEF2C;RBF0X2;RFX3;CD2AP;EML4;RFX7;ZC3H11A; RUFY3; RUFY2; CLOCK; CGGBP1; ZNF275; ZBTB8A; MTMR3; CEP85L; BAZ2A; BAZ2B; ZC3HAV1; MTMR4; ZNF24; SLC5A3; PRKAR2A; HEXIM1; ABCA1; EDEM3; PBX3; ERLIN2; VANG1; FAM135A; FERMT2; KCNC2; MECP2; TMEM47; NIPBL; SS18; CNOT6L; SLC39A10; ELOVL6; SIRT1; PHF20L1; FAM222B; MMP16; PLSCR4; KCNMA1; PXDN; PELI1; VAMP1; C5ORF51; PAFAH1B2; PAFAH1B1; STAU2; DLST; SNX30; NRAS; BTAF1; SNX27; PLAGL2; RICTOR; DMD; MEF2D; SRSF10; ANKIB1; MBD2; GATAD2B; NUDT21; SNX16; TAOK1; SERBP1; PKN2; LGR4; C11ORF57; YPEL2; ZNF451; CCNT2; NAB1; FAM13A; CASC4; RORA; PTAR1; SESN3; KPNA6; KPNA1; SH3GLB1; BNIP3L; ZBTB39; FOXP2; FBXW2; FOXP1; FRMD5; MAF; TXLNA; SLC9A6; SRSF2; ZNF436; IL6ST; ARL8B; INO80D; CREBL2; UBFD1; LIN7C; FOXO1; CORO1C; CTIF; SBNO1; ATXN1; RAP1A; KDSR; SOCS6; SLC38A2; SOCS5; ZBTB10; ARPC5; FOXN3; FBXO33; PTPRD; SON; S1;AK1; MDM4; OGT; CELF1; CELF2; PTEN; HTR2C; FAM208A; NRARP; KIAA1549; PPP6R3; ZNF644; YAF2; ARL5A; ACTR2; EMX2; APAF1; DST; ATRX;A RNT; VEZF1; RAD23B; MSL1; IL1RAPL1; LCOR; ETF1; SMCR8; BCAT1; PPP1R12B; CERS2; PPP1R15B; ROCK1; SRSF1;P PM1H; ZBTB44; PPM1K; ZBTB41; LRP6; CDC42; ELMSAN1; UBQLN1; BEND4; SH2B3; TRIM44; KCNJ2; NTRK2; HNRNPA3; PRRX1; MYO10; PCDH7; MGA; KIAA0232; SEPT14; SNRK; ST5; SYT10; EIF3J; PDCD4; TRIM37; SMAP1; RECK; CCNC; GCC2; IKZF2; RASSF2; BCAP29; SEC62; SCN1A; ARL10; ENTPD1; EPHA7; SMARCC1; GOLPH3L; ANK2; TMEM170B; CCNY; SUB1; ALPK3; ZNF710; TRIB2; KCTD15; SDC2; PIK3R1; RTF1; ZBTB5; ZBTB4; CDKN2AIP; MED12L; TGOLN2; SNX1; SEC14L1; MIER3; ZNF704; HLTf;

ST8SIA4; STK38L; RBM12; SCN3A; YES1; SMARCA5; BSDC1; RASSF8; SMARCA2; PTK2; WNK3; CALU; ID4; INTS6; CALM1; RCOR3; RGL1; RCOR1; PTPRT; NRP1; CSRN2; NRP2; CSRN3; CCDC126; AP4E1; OTUD7B; PTPRJ; PTPRK; GRIK2; WASL; BMI1; RAB22A; SYNCRIP; AKAP13; ACTR1A; PPP3CB; AKAP11; ENC1; REV3L; KIF1B; NDEL1; NCOA1; NCOA3; ENAH; ZADH2; PITPNM2; GLCC1; STX12; FOXC1; CAB39; STX16; NEDD9; XIAP; SH3BGR1; PAK1; SERTAD2; EPS15; MAP3K3; MAP3K1; MIB1; RIT1; DPY19L4; HNRNPA2B1; TARDBP; OTUD4; ZFAND5; WWC2; UBE3A; PRDM2; NR3C1; IGF1R; NR3C2; RGS3; CCND1; KIF5C; SH3GL2; CAST; TMOD1; CASR; TMOD3; CASK; UBE4A; RPRIP1L; SUP17L; TANC2; HNRNPUL1; GPD2; ADAM12; WDFY3; FBN2; KLHL18; DDX6; KLHL15; YTHDC1; SLC1A1; NPR3; SEL1L; PDS5B; PDS5A; VCIPI1; TMEM245; KIF3B; CAMTA1; TBC1D12; NXPH1; TBC1D15; QSER1; ZFHX3; AUTS2; CAV2; CAV1; MSN; HMGA2; SSH2; ZFHX4; UBE2W; GCLC; UBE2N; TAB3; TCF4; MXD1; UBE2K; GALK2; PICALM; FBN1; DDX3Y; YWHAE; RBM25; EDA; DDX3X; CHD9; CHD7; ADAR; LAMC1; PPP1R9A; CHD2; AFF3; SOBP; AFF4; LASP1; GRM7; MAN1A2; ZIC3; LRRFIP1; YWHAG; RBM33; MKL2; ARHGEF12; TBC1D9; NAV1; NAV2; YWHAZ; CREB1; ELF2; NAV3; ALS2; IRF2; SPOPL; RALA; GOSR1; ASAP1; HMGCR; CLCN3; ATAD2B; PRTG; CAND1; SH3TC2; CNR1; SPOCK1; PDLIM5; TRDMT1; ARFGEF1; TTC14; GALNT1; EYA4; ATP2B4; ATP2B1; ACVR2B; ACVR2A; U2SURP; CLCN6; CLCN5; UFM1; KATNBL1; NAA15; EHF; MAML1; RAPH1; HNRNPU; ADARB1; DCAF5; SLC4A4; BACH2; DCAF7; HOXA9; MYB; STMN1; DIP2A; MED1; MBNL1; GLCE; PRKCE; FNDC3B; AFAP1; FNDC3A; ARMC8; ATG14; ATG12; CPED1; PRKD3; HECW2; MAP1B; MAML3; CTBP2; PRDM10; MTDH; FAM160B1; RIC8B; SSR1; ZNF148; CDK19; FZD3; NFATC3; MEX3C; PHC3; ELL2; CYLD; ZNF37A; GPR180; CPEB4; ZNF131; WDR47; PHF20; CLTC; LPCAT1; PHF6; UBL3; ZNF280C; JARID2; RRP15; ZNF362; WDR37; EXOC8; TCF12; TET2; FAM126B; WDR33; ZEB1; AEBP2; TET3; ANGPTL2; PLCB1; RNF165; WDR26; CTDPI1; RNMT; PRUNE2; FIGN; ADCY1; FGD6; UBN2; ANKRD52; TAF9B; SF3A3; GABRA1; AGK; PCGF3; C1ORF21; SULF1; FAM104A; HIPK3; HIPK2; NFIA; NFIB; RLIM; IRS1; FMR1; IRS2; FGF1; LCLAT1; IPO7; CDC14A; SLC8A2; IPO5; PPP1CB; RIMS1; IPO8; RIMS4; CDH2; SLC39A9; CFL2; PAPOLG; LAMP2; GRB10; PAPOLA; ZNF326; SLC39A8; PCDHAC2; KCMF1; IGFBP5; PPTC7; TPM3; DYRK1A; RAB30; RALGAPB; CACNB4; KAT6B; SREK1; TOX; TTPAL; FKBP5; CSNK1G1; SLC26A2; CUL5; ABHD2; CUL3; ANKRD12; ITPR2; NEUROD1; HMBBOX1; BTBD3; PLXNA2; ABL2; SRGAP3; SRGAP2; MCL1; ANKRD28;

CD164; CEP350; BTBD7; ESRRG; CNOT4;
REEP1; MOB1B; CDK6; NBEA; SYNJ1;
CNOT1; MAFG; CPD; BCL2; SERINC1;
EIF4G3; ZNF532; BCL2L2; EIF4G2; ZC3H6;
PIK3C2A; ADAMTS5; AP1G1; PHACTR2;
TLK1; HIF1AN; TNPO1; LBR; ADAMTS6;
PHACTR4; PDCD6IP; SECISBP2L; SMC1A;
ASPH; PAPD5; LCORL; SOS2 ;HDAC4;
RAB1A; NUFIP2; LUZP1; SEMA3A; TULP4;
NSL1; DNAJB1; HECTD2; ZNF507; RSBN1L;
NHS; ASCC3; FNIP1; RFFL; WASF2; DCAF12;
JAZF1; RRGTT; TXNRD1; KLF3; RAB10;
VAPA; RAB14; VAPB; MGAT4A; SNRNP48;
TNRC6A; CUL4B; HS6ST2; PNN; RPS6KA3;
GOLGA4; ARFIP1; SOX6; SOX4; ACSL1;
YOD1; CHIT1; XRN1; AKAP9; PFN2; IGSF3;
DCUN1D3; EIF5A2; DCUN1D4; STC1; TWF1;
FXR1; MAP2; STC2; GSE1; STXBP5; SRPK2;
NUS1; DTNA; BCL11A; SIAH1; AMMECR1;
GDF6; PUM2; SRPK1; TMCC1; ROBO2;
TENM1; TENM2; CLIC4; TRAM1; OLA1;
TRAM2; ZCCHC14; ROBO1; EPB41L4B;
ZMYM2; XPO1; SH3PXD2A; UBXN7;
GABPA;T MED5; CDV3; ALDH5A1; TFEC;
SGK1; MAPRE1; VGLL4; DCP2; AKAP6;
TRAK1; AKAP2; PURB; CUX2; TBL1X;
MAP4K5; MAP4K4; RANBP2; MTX3;
FAM46A; RAB11A; MPP7 ;KBTBD2; MEGF9;
POGK; POGZ; KDM2A; TSC1; LIFR; RSBN1;
PDIA4 ;TBL1XR1 ;EOGT; CMPK1 ;STEAP2;
ATP6V1A; STK4; LPP; LTBP1; ZFP36L2;
SEL1L3; CAMSAP2; EFNB2; ARHGAP20;
MARK1; KLHDC10; SMAD2; SMAD4; CPSF6;
POU2F1; DNAJC13; HELZ; ESR1; AZIN1;
DIAPH2; DLG1; LIN28A; NR4A3; GDNF;
CAPRIN1; BRWD1; GRSF1; BRWD3;
ZCCHC2; DOCK3; THRB; USP31; SOWAHC;
ELAVL2; HS2ST1; MFSD6; PPP2R5E; DBT;
MAPK1IP1L; USP47; DCC; ABCC5; ARID1A;
TGFB1; IQCH; TGFB3; PEAK1; RBMS1;
LUC7L3; PDE5A; C2ORF69; TOB2; NR2C2;
THBS1; FAM168B; MAPK8; ERBB3; ERBB4;
MAPK1; NCAM1; S100PBP; USP24;
TMEM30A; WTAP; NEGR1; CMTM4; CMTM6;
SPRY4; NAP1L1; MEIS2; FMNL3; MEIS1;
WEE1; RPS6KB1; PDE7B; ATP13A3; PDE7A;
LPIN2

Tabela suplementar 5. Análise da função molecular para o *scaffold* endotelizado com musculo liso versus controle (*in natura*) - na base de dados GO Molecular Function 2021

Term	P-value	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
vascular endothelial growth factor receptor 2 binding (GO:0043184)	0.095420392	0.289219949	4.662169	10.95359	CCDC88A; ITGB3
vascular endothelial growth factor receptor binding (GO:0005172)	0.189062417	0.446175404	2.796702	4.658405	CCDC88A; ITGB3
vascular endothelial growth factor-activated receptor activity (GO:0005021)	0.008489151	0.064809322	10.49887	50.06878	NRP1; PDGFRA; NRP2
voltage-gated potassium channel activity involved in cardiac muscle cell action potential repolarization (GO:0086008)	0.645628613	0.751311869	0.99786	0.436594	KCNJ2
muscle alpha-actinin binding (GO:0051371)	0.264846668	0.540347242	2.150963	2.857779	PALLD; PDLIM5

Tabela suplementar 6. Análise da função biológica para o *scaffold* endotelizado com musculo liso *versus* controle (*in natura*) - na base de dados GO Biological Process 2021

Term	P-value	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
aorta development (GO:0035904)	0.239408	0.516637	2.330335	3.331413	ROBO2; ROBO1
aorta morphogenesis (GO:0035909)	0.315604	0.574495	1.863968	2.149654	RBPI; MYLK
aortic valve development (GO:0003176)	0.089251	0.290553	2.257943	5.455869	ROBO2; BMP2; BMPR2; ROCK1; ROBO1
aortic valve morphogenesis (GO:0003180)	0.361729	0.602055	1.446181	1.470562	ROBO2; ROCK1; ROBO1
artery development (GO:0060840)	5.54E-04	0.012858	6.138826	46.03452	ROBO2; NRP1; BMPR2; HOXA1; ACVR2B; TGFB1; ROBO1
artery morphogenesis (GO:0048844)	0.013044	0.095157	3.503759	15.20426	NRP1; TGFB2; BMPR2; HOXA1; LRP2; TGFB1
atrial cardiac muscle cell action potential (GO:0086014)	0.593041	0.73384	1.164295	0.608335	ANK2
atrial cardiac muscle cell to AV node cell signaling (GO:0086026)	0.424885	0.628012	1.996469	1.708851	ANK2
atrial septum development (GO:0003283)	0.001588	0.02495	7.786543	50.18778	NOTCH2; TGFB2; BMPR2; ANK2; MDM4
atrial septum morphogenesis (GO:0060413)	0.004472	0.049203	8.003861	43.30001	NOTCH2; TGFB2; BMPR2; SOX4
atrioventricular valve development (GO:0003171)	0.011548	0.088894	5.601802	24.99112	TGFB2; BMP2; BMPR2; MDM4
atrioventricular valve formation (GO:0003190)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	SMAD4
atrioventricular valve morphogenesis (GO:0003181)	0.001119	0.019648	6.472296	43.98293	SMAD4; TGFB2; BMP2; BMPR2; MDM4; SOX4
blood circulation (GO:0008015)	0.252955	0.539741	1.520432	2.0899	GCLC; SGCD; CXCL12; ROCK1; COL4A3
blood vessel diameter maintenance (GO:0097746)	0.688477	0.794654	0.84644	0.315953	GCLC; ROCK1
blood vessel endothelial cell migration (GO:0043534)	0.195994	0.462595	2.097974	3.419007	EFNB2; NRP1; ROBO1
blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:0002043)	0.339572	0.574495	2.795356	3.019177	NRARP
blood vessel morphogenesis (GO:0048514)	0.001039	0.019648	3.434952	23.59631	TGFB3; EFNB2; NRP1; CDH2; CAV1; SLC1A1; ITGB8; HAS2; HOXA1; RBPI; TGFB1
BMP signaling pathway (GO:0030509)	0.001111	0.019648	3.182637	21.64984	TGFB3; SMAD2; SMAD4; TGFB2; BMP2; BMPR2; PDCD4; GDF6; ACVR2B; SMAD5; RUNX2; ACVR2A
BMP signaling pathway involved in heart development (GO:0061312)	0.292285	0.543242	3.494382	4.29818	BMP2
cardiac atrium development (GO:0003230)	0.09542	0.294268	4.662169	10.95359	ANK2; MDM4
cardiac atrium morphogenesis (GO:0003209)	0.034288	0.175858	3.733534	12.59304	NOTCH2; TGFB2; BMP2; BMPR2
cardiac cell development (GO:0055006)	0.593041	0.73384	1.164295	0.608335	ALPK3
cardiac conduction system development (GO:0003161)	0.081786	0.272187	2.665952	6.6746	NOTCH2; SMAD4; MAML1; SMAD5
cardiac endothelial cell differentiation (GO:0003348)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	SMAD4; NRG1

cardiac epithelial to mesenchymal transition (GO:0060317)	2.09E-04	0.006934	7.556694	64.02879	TGFB3; PD4; TGFB1	TGFB2; HAS2;	BMP2; RBPJ;
cardiac left ventricle morphogenesis (GO:0003214)	0.239408	0.516637	2.330335	3.331413	SMAD4; RBPJ		
cardiac muscle cell action potential (GO:0086001)	0.046641	0.204144	2.800751	8.585094	YWHAE; KCNJ2; SCN1A	DMD;	ANK2;
cardiac muscle cell action potential involved in contraction (GO:0086002)	0.14955	0.383979	2.072851	3.938677	NEDD4L; SCN1A	ANK2;	KCNJ2;
cardiac muscle cell contraction (GO:0086003)	0.365521	0.602055	1.644501	1.655079	KCNJ2; SCN1A		
cardiac muscle cell development (GO:0055013)	0.213657	0.485055	1.997964	3.083628	PDGFRA; ALPK3; PDLIM5		
cardiac muscle cell differentiation (GO:0055007)	0.019319	0.12254	3.686385	14.54892	AKAP13; NRG1; ALPK3	MEF2C;	BMP2;
cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0099622)	0.164473	0.408737	3.107613	5.609274	YWHAE; KCNJ2		
cardiac muscle cell myoblast differentiation (GO:0060379)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	NRG1; RBPJ		
cardiac muscle cell proliferation (GO:0060038)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	TGFB3; TGFB2		
cardiac muscle contraction (GO:0060048)	0.904879	0.937165	0.422903	0.042271	DMD		
cardiac muscle hypertrophy (GO:0003300)	0.424885	0.628012	1.996469	1.708851	HDAC4		
cardiac muscle tissue development (GO:0048738)	0.007935	0.070522	2.87011	13.88118	NOTCH2; AKAP13; BMP2; MAML1; NRG1; SMAD5	SMAD4; BMPR2; SGCD;	
cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055008)	0.640085	0.763863	0.931234	0.415475	TGFB3; BMP2		
cardiac myofibril assembly (GO:0055003)	0.264847	0.543242	2.150963	2.857779	PDGFRA; NEBL		
cardiac pacemaker cell development (GO:0060926)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	MAML1		
cardiac right ventricle morphogenesis (GO:0003215)	0.051371	0.213238	4.1982	12.46312	TGFB2; ZFPM2; SOX4		
cardiac ventricle development (GO:0003231)	0.749273	0.830759	0.735068	0.212179	MDM4		
cardiac ventricle formation (GO:0003211)	0.005103	0.052672	13.99925	73.88594	MEF2C; SOX11; SOX4		
cardiac ventricle morphogenesis (GO:0003208)	0.070771	0.252738	2.211239	5.85603	TGFB3; SOX11; RBPJ; SOX4	MEF2C;	TGFB2;
cardiocyte differentiation (GO:0035051)	0.006357	0.061732	7.003003	35.42291	AKAP13; NRG1	BMP2;	TGFB2;
cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0002042)	0.114744	0.329188	2.79805	6.057913	EFNB2; NRP1; ROBO1		
cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	0.00796	0.070522	2.531803	12.23701	NRP1; ATRN; PEAK1; PIK3R1; MEGF9	MEF2C; ITGB3; SRGAP2; FERMT2;	ABI2; LAMC1;
cell surface receptor signaling pathway involved in heart development (GO:0061311)	0.100377	0.301852	2.998071	6.892046	NOTCH2; BMP2; RBPJ		
cellular response to fibroblast growth factor stimulus (GO:0044344)	0.019246	0.12254	2.105438	8.317446	FGF5; FGF7; RFX2; FRS2; ZFP36L2	SPRED1; TIA1; RAB14; MAPK1;	
cellular response to heat (GO:0034605)	0.435249	0.638967	1.270613	1.056942	YWHAE; FGF1; THBS1		
cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus (GO:0035924)	0.398799	0.616715	1.352733	1.243563	NRP1; NUS1; FOXC1		

embryonic heart tube morphogenesis (GO:0003143)	0.831003	0.887933	0.620323	0.114835	MEF2C; ZIC3
embryonic hemopoiesis (GO:0035162)	0.051371	0.213238	4.1982	12.46312	KMT2A; KIT; SH2B3
endocardial cell differentiation (GO:0060956)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	SMAD4; NRG1
endocardial cushion development (GO:0003197)	0.047661	0.204331	3.293941	10.02559	TGFB2; BMP2; BMPR2; MDM4
endocardial cushion morphogenesis (GO:0003203)	0.12983	0.354236	2.623031	5.354996	TGFB2; BMP2; MDM4
endothelial cell apoptotic process (GO:0072577)	0.002685	0.034427	21	124.3217	BMPR2; COL4A3; HIPK1
endothelial cell chemotaxis (GO:0035767)	0.463318	0.652297	1.746816	1.343899	NRP1
endothelial cell development (GO:0001885)	0.006351	0.061732	4.205414	21.27578	RAP1B; RAP1A; RDX; STC1; MSN; RAPGEF2
endothelial cell differentiation (GO:0045446)	0.239408	0.516637	2.330335	3.331413	BMPR2; ACVR2B
endothelial cell migration (GO:0043542)	0.744526	0.830759	0.754771	0.222664	NRP1; STARD13
endothelial cell morphogenesis (GO:0001886)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	STC1
endothelial cell proliferation (GO:0001935)	0.114744	0.329188	2.79805	6.057913	DLG1; BMPR2; NRARP
endothelial tube morphogenesis (GO:0061154)	0.14052	0.368721	3.496252	6.861066	STARD13; RBPJ
fibroblast growth factor receptor signaling pathway (GO:0008543)	0.010761	0.084548	2.412736	10.93419	FGF5; FGF7; SPRED1; TIA1; RBFOX2; RAB14; MAPK1; FRS2; SHOC2; FGF1; CBL
heart contraction (GO:0060047)	0.769159	0.845185	0.715988	0.187917	SGCD; DMD
heart development (GO:0007507)	9.08E-05	0.00376	2.541445	23.65159	FOXC1; BMPR2; CHD7; PTEN; AKAP13; NIPBL; SGCD; ERBB3; ERBB4; PDLIM5; MEF2D; SOX4; MEF2C; TGFB2; HEG1; POU4F1; PTK2; TGFB1; TGFB3; BMP2; DLC1; ALPK3; BCOR; ZFPM2; FBN1
heart field specification (GO:0003128)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	MEF2C; LRP2
heart looping (GO:0001947)	0.791696	0.862073	0.680989	0.159064	MEF2C; ZIC3
heart morphogenesis (GO:0003007)	0.007935	0.070522	2.87011	13.88118	TGFB3; NIPBL; TGFB2; BMP2; DLC1; CHD7; MDM4; TGFB1; PTK2
heart process (GO:0003015)	0.620243	0.751919	1.074676	0.513312	SGCD
heart trabecula formation (GO:0060347)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	TGFB3
heart trabecula morphogenesis (GO:0061384)	0.006972	0.064903	5.004293	24.85087	TGFB3; TGFB2; NRG1; RBPJ; TGFB1
hematopoietic progenitor cell differentiation (GO:0002244)	0.640085	0.763863	0.931234	0.415475	KIT; MLLT3
hematopoietic stem cell differentiation (GO:0060218)	0.499184	0.678566	1.552643	1.078745	MLLT3
hematopoietic stem cell migration (GO:0035701)	0.292285	0.543242	3.494382	4.29818	BCL11B
hematopoietic stem cell proliferation (GO:0071425)	0.532655	0.698839	1.397303	0.880134	RUNX1
membrane depolarization during cardiac muscle cell action potential (GO:0086012)	0.315604	0.574495	1.863968	2.149654	ANK2; KCNJ2

membrane repolarization during cardiac muscle cell action potential (GO:0086013)	0.264847	0.543242	2.150963	2.857779	YWHAE; KCNJ2
mesenchymal cell development (GO:0014031)	0.001119	0.019648	6.472296	43.98293	FOXC1; CDH2; PEF1; NRG1; SOX11; KBTBD8
mesenchymal cell differentiation (GO:0048762)	0.001761	0.02677	3.425487	21.7237	TGFB3; MEF2C; FOXC1; TGFB2; BMP2; ROCK1; HMGA2; RBPJ; TGFB1; LRP6
mesenchyme development (GO:0060485)	0.018872	0.12099	4.667668	18.53096	BMP2; BMP2; BMP2; HMGA2; TGFB1
mesenchyme morphogenesis (GO:0072132)	0.023403	0.141321	4.308385	16.17758	SMAD2; TGFB2; BMP2; MDM4
muscle cell development (GO:0055001)	0.066026	0.245761	2.500268	6.794993	NEBL; DMD; ANK2; ALPK3; IGF1
muscle cell differentiation (GO:0042692)	0.203403	0.475784	1.804999	2.874576	MEF2C; NEBL; RORA; DMD
muscle cell fate commitment (GO:0042693)	0.463318	0.652297	1.746816	1.343899	MEF2C
muscle cell migration (GO:0014812)	0.14052	0.368721	3.496252	6.861066	ROCK1; ITGB3
muscle contraction (GO:0006936)	0.360283	0.602055	1.175266	1.199788	TMOD1; DTNA; ASPH; ROCK1; TPM3; TMOD3; TMOD2; DMD; CALM1; MYLK
muscle filament sliding (GO:0030049)	0.470841	0.661328	1.197878	0.902285	TMOD1; TPM3; DMD
muscle organ development (GO:0007517)	0.014169	0.100385	2.57655	10.96757	FXR1; MEF2C; SGCD; TCF12; DMD; IGF1; CHD2; SOX6; MEF2D
muscle tissue morphogenesis (GO:0060415)	0.100377	0.301852	2.998071	6.892046	TGFB3; BMP2; MYLK
myoblast differentiation (GO:0045445)	0.074058	0.252738	3.498125	9.105304	MBNL1; NRG1; IGF1
myoblast fusion (GO:0007520)	0.264847	0.543242	2.150963	2.857779	ADAMTS5; ADAM12
myoblast migration (GO:0051451)	0.424885	0.628012	1.996469	1.708851	ROCK1
negative regulation of blood coagulation (GO:0030195)	0.937225	0.959021	0.357726	0.023192	PDGFRA
negative regulation of blood pressure (GO:0045776)	0.645629	0.763863	0.99786	0.436594	BMP2
negative regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043537)	0.073347	0.252738	2.413923	6.306502	MECP2; MEF2C; STARD13; ATP2B4; THBS1
negative regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:1903588)	0.339572	0.574495	2.795356	3.019177	THBS1
negative regulation of blood vessel morphogenesis (GO:2000181)	0.005396	0.054314	2.553969	13.33702	MECP2; ATF2; SPRED1; FOXC1; TGFB2; ROCK1; AGO1; COL4A3; ATP2B4; SULF1; THBS1; AMOT
negative regulation of BMP signaling pathway (GO:0030514)	5.39E-04	0.01275	3.770879	28.38137	SMAD4; BMP2; BMP2; UBE2D3; CRIM1; LRP2; ACVR2B; SMAD5; ACVR2A; HIPK2; FBN1
negative regulation of cardiac muscle cell proliferation (GO:0060044)	0.292285	0.543242	3.494382	4.29818	VGLL4
negative regulation of cardiac muscle hypertrophy (GO:0010614)	0.041524	0.186066	4.664916	14.84133	SMAD4; ATP2B4; FOXO1

negative regulation of cardiac muscle tissue growth (GO:0055022)	0.339572	0.574495	2.795356	3.019177	VGLL4
negative regulation of cardiocyte differentiation (GO:1905208)	0.008489	0.072249	10.49887	50.06878	BMP2; FRS2; SOX6
positive regulation of blood circulation (GO:1903524)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	TGFB2
positive regulation of blood coagulation (GO:0030194)	0.691425	0.794654	0.873034	0.322149	THBS1
positive regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043536)	0.013405	0.096441	2.804819	12.09478	MAP3K3; NUS1; SP1; AKT3; PIK3C2A; ETS1; THBS1; SIRT1
positive regulation of BMP signaling pathway (GO:0030513)	4.02E-05	0.002024	7.025622	71.11436	SMAD2; SMAD4; BMPR2; SOX11; RBPJ; SULF1; ACVR2B; ACVR2A; RNF165
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell apoptotic process (GO:1905461)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	PDCCD4; E2F3
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell differentiation (GO:1905065)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	KIT
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell migration (GO:1904754)	0.09542	0.294268	4.662169	10.95359	NR4A3; IGFBP5
positive regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation (GO:1904707)	0.047661	0.204331	3.293941	10.02559	NR4A3; IGFBP5; IGF1; MEF2D
positive regulation of vascular endothelial cell proliferation (GO:1905564)	0.214097	0.485055	2.54232	3.918541	SP1; AKT3
positive regulation of vascular endothelial growth factor production (GO:0010575)	0.081786	0.272187	2.665952	6.6746	ARNT; RORA; SULF1; IL6ST
positive regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0030949)	0.025025	0.146096	5.998392	22.12135	ITGB3; GRB10; ARNT
positive regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway (GO:1900748)	0.339572	0.574495	2.795356	3.019177	ROBO1
positive regulation of vasculature development (GO:1904018)	0.039234	0.183032	1.870493	6.057068	SP1; ADAM12; HMGA2; ITGB8; FGF1; HIPK1; ETS1; SIRT1; THBS1; RUNX1; MTDH; HIPK2
positive regulation of vasculogenesis (GO:2001214)	0.025025	0.146096	5.998392	22.12135	RAP1A; RAPGEF2; HIF1AN
positive regulation of vasoconstriction (GO:0045907)	0.669318	0.780622	0.931286	0.373907	CAV1
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	0.009138	0.075341	1.798815	8.445962	ATF2; FOXC1; TGFB2; ROCK1; ATP2B4; HMGA2; HIPK1; SULF1; FGF1; SIRT1; ETS1; THBS1; RUNX1; MTDH; HIPK2; AMOT; MECP2; SPRED1; SP1; AGO1; ADAM12; COL4A3; ITGB8
regulation of angiotensin levels in blood (GO:0002002)	0.563891	0.718617	1.270208	0.727694	MME
regulation of blood circulation (GO:1903522)	0.911244	0.941889	0.410443	0.038148	CELF2
regulation of blood coagulation (GO:0030193)	0.546643	0.711607	1.117781	0.675094	CAV1; THBS1

regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043535)	0.010108	0.081099	2.745028	12.61175	MECP2; NUS1; MEF2C; SP1; AKT3; ATP2B4; ETS1; SIRT1; THBS1
regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:1903587)	0.669318	0.780622	0.931286	0.373907	THBS1
regulation of blood-brain barrier permeability (GO:1905603)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	SH3GL2
regulation of BMP signaling pathway (GO:0030510)	3.41E-05	0.001806	3.758384	38.6568	SMAD2; SMAD4; BMPR2; UBE2D3; CRIM1; XIAP; SOX11; LRP2; RBPJ; SULF1; ACVR2B; SMAD5; ACVR2A; HIPK2; BMP2; RNF165
regulation of cardiac conduction (GO:1903779)	0.072275	0.252738	2.042764	5.36692	ASPH; ATP2B4; ITPR2; ATP2B3; ANK2; ATP2B1; SLC8A2
regulation of cardiac muscle cell action potential (GO:0098901)	0.022856	0.140909	3.501878	13.23205	DLG1; CAV1; AKAP9; ANK2; CALM1
regulation of cardiac muscle cell action potential involved in regulation of contraction (GO:0098909)	0.09542	0.294268	4.662169	10.95359	CAV1; AKAP9
regulation of cardiac muscle cell contraction (GO:0086004)	0.007713	0.070085	4.004941	19.48359	DLG1; CAV1; AKAP9; PDE4B; STC1; ANK2
regulation of cardiac muscle cell differentiation (GO:2000725)	4.34E-04	0.010926	11.68169	90.44758	EFNB2; BMP2; MEF2C; FRS2; SOX6
regulation of cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0099623)	0.437494	0.638967	1.397601	1.155387	AKAP9; ANK2
regulation of cardiac muscle cell proliferation (GO:0060043)	3.60E-05	0.001858	8.642725	88.43341	TGFB3; MEF2C; ERBB4; RBPJ; ZFPM2; TGFB1; VGLL4; RUNX1
regulation of cardiac muscle contraction (GO:0055117)	0.217672	0.489704	1.748498	2.666047	PDE4B; STC1; ANK2; CALM1
regulation of cardiac muscle contraction by calcium ion signaling (GO:0010882)	0.161883	0.408737	2.331333	4.245082	ANK2; DMD; CALM1
regulation of cardiac muscle contraction by regulation of the release of sequestered calcium ion (GO:0010881)	0.100377	0.301852	2.998071	6.892046	ANK2; DMD; CALM1
regulation of cardiac muscle hypertrophy (GO:0010611)	0.004163	0.047414	4.673183	25.61625	MTPN; SMAD4; NR4A3; ROCK1; IGF1; IL6ST
regulation of cardiac muscle hypertrophy in response to stress (GO:1903242)	0.055849	0.217771	6.994003	20.17837	ATP2B4; FOXO1
regulation of cardioblast differentiation (GO:0051890)	0.292285	0.543242	3.494382	4.29818	TGFB2
regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000351)	0.802219	0.8676	0.664739	0.146491	PDCCD4; THBS1
regulation of endothelial cell chemotaxis (GO:2001026)	0.264847	0.543242	2.150963	2.857779	FGF1; THBS1
regulation of endothelial cell chemotaxis to fibroblast growth factor (GO:2000544)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	FGF1
regulation of endothelial cell development (GO:1901550)	0.117421	0.329188	3.995931	8.559244	ROCK1; ZDHHC21
regulation of endothelial cell differentiation (GO:0045601)	0.117421	0.329188	3.995931	8.559244	ZEB1; VEZF1

regulation of endothelial cell migration (GO:0010594)	0.0727	0.252738	1.774157	4.6508	NRP1; NRP2; BMPR2; ITGB3; STC1; FGF1; ETS1; THBS1; PTK2; FOXP1
regulation of endothelial cell proliferation (GO:0001936)	0.001094	0.019648	2.740987	18.68697	NRP1; NRP2; BMPR2; CAV2; ITGB3; CAV1; ARNT; NRARP; SULF1; SIRT1; THBS1; TGFBR1; NRAS; BMP2; AKT3
regulation of endothelial tube morphogenesis (GO:1901509)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	FGF1; FOXP1
regulation of muscle cell differentiation (GO:0051147)	0.417118	0.628012	1.31039	1.145787	CDC42; MEF2C; CDH2
regulation of muscle contraction (GO:0006937)	0.286913	0.543242	1.677929	2.095026	KCNA1; CAV1; PPP1R12B
regulation of muscle organ development (GO:0048634)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	MTPN
regulation of muscle system process (GO:0090257)	0.189062	0.450396	2.796702	4.658405	KCNA1; PPP1R12B
regulation of smooth muscle cell apoptotic process (GO:0034391)	0.018419	0.119922	6.9985	27.95477	IGF1; SIRT1; LRP6
regulation of smooth muscle cell migration (GO:0014910)	0.145565	0.376524	2.468602	4.757317	NRP1; IGFBP5; IGF1
regulation of smooth muscle cell proliferation (GO:0048660)	0.227645	0.509671	1.589714	2.352725	NR4A3; IGFBP5; IGF1; THBS1; FOXP1
regulation of smooth muscle contraction (GO:0006940)	0.145565	0.376524	2.468602	4.757317	CAV1; ZDHHC21; ATP2B1
regulation of vascular associated smooth muscle cell apoptotic process (GO:1905459)	0.008489	0.072249	10.49887	50.06878	PDCD4; E2F3; IGF1
regulation of vascular associated smooth muscle cell differentiation (GO:1905063)	0.008489	0.072249	10.49887	50.06878	KIT; NFATC3; PDCD4
regulation of vascular associated smooth muscle cell migration (GO:1904752)	0.041524	0.186066	4.664916	14.84133	MEF2C; NR4A3; IGFBP5
regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation (GO:1904705)	0.010259	0.081215	3.271583	14.9826	MEF2C; NR4A3; IGFBP5; PTEN; PDCD4; IGF1; MEF2D
regulation of vascular associated smooth muscle contraction (GO:0003056)	0.038934	0.182245	9.325837	30.2706	ZDHHC21; ATP2B1
regulation of vascular endothelial cell proliferation (GO:1905562)	0.028537	0.158414	4.000429	14.2277	MEF2C; SP1; AKT3; COL4A3
regulation of vascular endothelial growth factor production (GO:0010574)	0.102337	0.305986	2.433869	5.547963	ARNT; RORA; SULF1; IL6ST
regulation of vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0030947)	0.213657	0.485055	1.997964	3.083628	ITGB3; GRB10; ARNT
regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway (GO:1900746)	0.731308	0.81962	0.775947	0.24281	ROBO1
regulation of vasculature development (GO:1901342)	0.845555	0.896151	0.536963	0.090082	ETS1
regulation of vasculogenesis (GO:2001212)	0.062232	0.234773	3.81634	10.59755	RAP1A; RAPGEF2; HIF1AN
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	0.137049	0.368721	2.152691	4.27829	BMPR2; CAV1; ZDHHC21; ATP2B1

regulation of ventricular cardiac muscle cell action potential (GO:0098911)	0.189062	0.450396	2.796702	4.658405	DLG1; CAV1
regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization (GO:0060307)	0.340711	0.574495	1.747376	1.881435	AKAP9; ANK2
smooth muscle cell differentiation (GO:0051145)	0.563891	0.718617	1.270208	0.727694	MEF2C
smooth muscle cell migration (GO:0014909)	0.383702	0.602055	2.329338	2.231248	ITGB3
smooth muscle contraction (GO:0006939)	0.062232	0.234773	3.81634	10.59755	ROCK1; PIK3C2A; MYLK
smooth muscle tissue development (GO:0048745)	0.499184	0.678566	1.552643	1.078745	MYLK
vascular associated smooth muscle contraction (GO:0014829)	0.424885	0.628012	1.996469	1.708851	PIK3C2A
vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0048010)	0.004584	0.049895	2.758598	14.85575	CDC42; NRP1; NRP2; ROCK1; ITGB3; PIK3R1; SULF1; CRK; PAK2; WASF2; PTK2
vascular endothelial growth factor signaling pathway (GO:0038084)	0.062232	0.234773	3.81634	10.59755	NRP1; NUS1; FOXC1
vascular process in circulatory system (GO:0003018)	0.214097	0.485055	2.54232	3.918541	GCLC; ROCK1
vascular transport (GO:0010232)	0.003667	0.04404	2.573206	14.43186	SLC38A1; ABCC5; SLC2A13; SLC1A1; SLC1A2; ATP2B4; LRP2; SLC4A4; SLC5A3; SLC7A2; SLC8A2; SLC4A8; SLC38A2
vasculature development (GO:0001944)	0.100377	0.301852	2.998071	6.892046	PDGFRA; BMPR2; ACVR2B
vasculogenesis (GO:0001570)	0.066026	0.245761	2.500268	6.794993	TGFBR3; SPRED1; CAV1; HAS2; ITGB8
vasoconstriction (GO:0042310)	0.532655	0.698839	1.397303	0.880134	PIK3C2A
vasodilation (GO:0042311)	0.620243	0.751919	1.074676	0.513312	KCNMA1
venous blood vessel development (GO:0060841)	0.09542	0.294268	4.662169	10.95359	BMPR2; ACVR2B
ventricular cardiac muscle cell action potential (GO:0086005)	0.340711	0.574495	1.747376	1.881435	NEDD4L; ANK2
ventricular cardiac muscle cell differentiation (GO:0055012)	0.292285	0.543242	3.494382	4.29818	MEF2C
ventricular cardiac muscle tissue development (GO:0003229)	0.82262	0.880326	0.581773	0.113597	TGFBR3
ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055010)	0.001474	0.02417	4.31835	28.15322	TGFBR3; SMAD4; TGFB2; NRG1; LRP2; RBPJ; ZFPM2; TGFBR1
ventricular compact myocardium morphogenesis (GO:0003223)	0.005103	0.052672	13.99925	73.88594	TGFBR3; LRP2; TGFBR1
ventricular septum development (GO:0003281)	2.54E-05	0.001437	5.730454	60.62444	ROBO2; TGFBR3; SMAD4; TGFB2; BMPR2; SOX11; MDM4; ZFPM2; SOX4; TGFBR1; ROBO1
ventricular septum morphogenesis (GO:0060412)	7.38E-06	5.51E-04	7.812133	92.31373	ROBO2; TGFBR3; SMAD4; TGFB2; BMPR2; SOX11; ZFPM2; SOX4; TGFBR1; ROBO1
ventricular trabecula myocardium morphogenesis (GO:0003222)	0.001116	0.019648	14.00901	95.23605	TGFB2; NRG1; RBPJ; TGFBR1

Tabela suplementar 7. Análise da função molecular do *scaffold* endotelizado versus controle (célula-tronco indiferenciadas) - na base de dados GO Cell Type

Term	P-value	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	TRIM71;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	PID1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	PHF20;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	NAB1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	BACH1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	FGF2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	CELSR2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	AFF4;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ROBO1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	RPS6KA 5;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MYB;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ITGB8;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MBNL1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MAP2K1 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	TGIF2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	FBXW7;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	SOX11;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MITF;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ZBTB34;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	DICER1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ASH1L;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ATG14;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MED26;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	TGFBR1 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	FOXP1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	HIC2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	DMTF1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	IRF2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	CLOCK;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	DNMT1;

Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ROCK1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	PLAG1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	YTHDC1 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	BAZ2A;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	DLL1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	PDCD10;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MIER1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	IGF2BP1 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	IGF2BP3 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	STX3;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	SLC38A 2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	RNF20;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	YTHDF2 ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	SMAD3;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	NFYB;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	INSR;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	RDX;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	SMARC A5;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	HMGA2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	LARP4;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	KLF4;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ESR1;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ACVR2B ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	ST18;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	RYBP;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	MAFB;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	NFIA;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	SPRY2;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	FAM98A ;
Regulation Of Gene Expression (GO:0010468)	4,95E-08	1,58E-05	2,307408111	38,81181772	PHF19
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SERPIN E2;

Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	ROCK1;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	PTEN;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	NEDD9;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	FGF2;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	ROBO1;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	IGF1R;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	PPP3CA;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SDCBP;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	PDCD10;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	ERBB4;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SRGAP3 ;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	RNF20;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	ACVR1;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SUN2;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	JAG1;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SEMA4 D;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SEMA6 D;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	INSR;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	RDX;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	MITF;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	TGFB1 ;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SMAD7;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	RAP2C;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	DAB2;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	NAV3;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	KIT;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	NF1;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	SPRY2;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	RECK;
Regulation Of Cell Migration (GO:0030334)	2,69E-07	4,57E-05	3,071773415	46,4747411	FERMT2

Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	TRIM71;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	PPP6C;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CDKN1B;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CCND2;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CDC34;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CCND1;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CUL5;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	CUL2;
Cell Cycle G1/S Phase Transition (GO:0044843)	5,80E-06	6,31E-04	8,141023256	98,16183776	E2F3
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	JAG1;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	YTHDF2 ;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	SMAD3;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	SEMA4D;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	PTEN;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	DLL1;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	TGFBR1 ;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	SMAD7;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	SPRED1;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	COL5A1 ;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	MYB;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	COL5A2 ;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	PDCD4;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	SPRY2;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	ITGAV;

Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	CNTN4;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	FERMT2 ;
Negative Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045596)	6,26E-06	6,55E-04	3,743962758	44,85879053	RUNX1T1
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	ACVR1;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	CDS1;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	AKIRIN1;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	SMAD3;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	MMD;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	SOX11;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	AXIN2;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	ACVR2B ;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	TGFBR1 ;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	ACVR2A;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	XKR8;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	TMEM100;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	RPS6KA3;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	PPP3CA;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	SDCBP;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	DAB2;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	RBM24;
Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	FERMT2 ;

Positive Regulation Of Cell Differentiation (GO:0045597)	1,26E-04	0,004745621	2,824002783	25,35012481	FGFR1
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	ADAMT S3;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	COL5A1 ;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	COL11A 1;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	COL5A3 ;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	COL12A 1;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	COL5A2 ;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	NF1;
Collagen Fibril Organization (GO:0030199)	9,18E-06	8,92E-04	9,137959375	105,9868741	TGFB1
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	ZNF512 B;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	SMAD3;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	MYB;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	MRTFB;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	FOS;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	KLF4;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	FGF2;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	TEAD1;
Regulation Of miRNA Transcription (GO:1902893)	1,69E-05	0,001353642	6,99876	76,89672023	ESR1
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	FXR1;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	YTHDF2 ;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	ROCK1;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	FMR1;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	PRKCD;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	IGF2BP1 ;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	AXIN2;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	RBM24;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	DCP2;
Regulation Of mRNA Stability (GO:0043488)	1,74E-05	0,001353642	6,083103707	66,66086072	PAIP1
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	LIN28B;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	SMAD3;

Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	MYB;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	MRTFB;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	FOS;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	KLF4;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	FGF2;
Positive Regulation Of miRNA Metabolic Process (GO:2000630)	3,00E-05	0,001943809	7,575093715	78,88847238	TEAD1
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	RAB10;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	C2CD5;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	INSR;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	PDE3B;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	DENND 4C;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	SLC2A1;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	MYO5A;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	INHBB;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	CPEB2;
Response To Insulin (GO:0032868)	3,12E-05	0,00197255	5,640846911	58,52932989	RHOQ
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	RAB10;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	C2CD5;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	INSR;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	DENND 4C;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	PDE3B;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	GRB10;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	MYO5A;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	INHBB;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	CPEB2;
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	RHOQ;I
Cellular Response To Insulin Stimulus (GO:0032869)	4,36E-05	0,002420145	4,870230924	48,90131851	GF1R
Activin Receptor Signaling Pathway (GO:0032924)	3,62E-05	0,002191569	17,56854257	179,6423857	SMAD3;
Activin Receptor Signaling Pathway (GO:0032924)	3,62E-05	0,002191569	17,56854257	179,6423857	INHBB;

Activin Receptor Signaling Pathway (GO:0032924)	3,62E-05	0,002191569	17,56854257	179,6423857	ACVR2B ;
Activin Receptor Signaling Pathway (GO:0032924)	3,62E-05	0,002191569	17,56854257	179,6423857	ACVR2 A;
Activin Receptor Signaling Pathway (GO:0032924)	3,62E-05	0,002191569	17,56854257	179,6423857	TGFB1
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	ACVR1;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SUN2;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SEMA6 A;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SEMA4 D;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	INSR;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SEMA6 D;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SEMA3 A;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	RDX;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	NEDD9;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	RTN4;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	TGFB1 ;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	IGF1R;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	PPP3CA;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SDCBP;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	DAB2;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	PDCD10;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	KIT;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	SPRY2;
Positive Regulation Of Cell Migration (GO:0030335)	7,50E-05	0,0035415	2,948471404	28,00628778	FERMT2
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	RNF20;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	JAG1;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	MACIR;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	PTEN;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	NEDD9;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	MITF;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	FGF2;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	SMAD7;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	ROBO1;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	RAP2C;

Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	NAV3;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	NF1;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	SRGAP3 ;
Negative Regulation Of Cell Migration (GO:0030336)	7,57E-05	0,0035415	3,671452783	34,83688092	RECK
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	PPP1CB;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	PPP3CA;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	NUAK1;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	YTHDF2 ;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	ROCK1;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	SEMA4 D;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	PDE3B;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	ITGAV;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	STX3;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	TNPO1;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	CELSR2;
Regulation Of Cell Adhesion (GO:0030155)	3,22E-04	0,0092126	3,541064569	28,47745713	DLL1
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	RBM47;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	CSDE1;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	IGF2BP1 ;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	IGF2BP3 ;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	AXIN2;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	RBM24;
mRNA Stabilization (GO:0048255)	3,71E-04	0,010103861	5,894465616	46,55697798	PAIP1
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	TRIM71;
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	RAB14;
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	FLRT3;
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	SHOC2;
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	FGF2;
Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Pathway (GO:0008543)	4,22E-04	0,01113867	7,033435749	54,65934826	FGFR1

miRNA Metabolic Process (GO:0010586)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	TRIM71;
miRNA Metabolic Process (GO:0010586)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	LIN28B;
miRNA Metabolic Process (GO:0010586)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	LIN28A;
miRNA Metabolic Process (GO:0010586)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	DICER1
Positive Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903672)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	ITGA5;
Positive Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903672)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	KLF4;
Positive Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903672)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	DLL1;
Positive Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903672)	4,53E-04	0,011563988	14,0270027	108,0131522	FGF2
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	MYRF;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	PTEN;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	TGFA;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	NEDD9;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	FGF2;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	DLL1;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	LRP6;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	IGF1R;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	RPS6KA 3;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	PPP3CA;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	SDCBP;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	CCND2;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	PDCD10;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	ERBB4;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	SSR1;

Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	ITGAV;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	STX3;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	TNPO1;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	TEAD1;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	CNOT6L ;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	INSR;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	DICER1;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	INO80;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	AXIN2;
Positive Regulation Of Cellular Process (GO:0048522)	6,71E-04	0,015732167	2,023797935	14,78832123	TGFBRI ;
Regulation Of Cell Migration Involved In Sprouting Angiogenesis (GO:0090049)	8,81E-04	0,01888028	7,724603175	54,33644187	AQP11;
Regulation Of Vascular Endothelial Cell Proliferation (GO:1905562)	9,55E-04	0,020145496	11,01951909	76,62661614	FAM98A ;
Regulation Of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathway (GO:1900746)	0,001185614	0,022884815	10,28435644	69,29079141	EIF4G2;
Mesenchymal Cell Migration (GO:0090497)	0,001194283	0,022884815	7,151675485	48,13227321	FGFR1
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	TRIM71;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	BTG2;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	CDKN1 B;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	PTEN;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	TGFA;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	PDS5B;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	PPM1D;

Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	FGF2;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	DLL1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	IGF1R;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	PPP3CA;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	SDCBP;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	NUAK1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	CCND2;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	PDCD10;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	ERBB4;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	SSR1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	ITGAV;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	STX3;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	E2F7;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	MAP2K1 ;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	JAG1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	CNOT6L ;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	SMAD3;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	INSR;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	AXIN2;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	ST18;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	TGFBR1 ;

Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	DDAH1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	KIT;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	AQP11;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	ULK1;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	FAM98A ;
Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0042127)	0,001259198	0,02395998	1,834357204	12,24851751	FGFR1
Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903670)	0,001378468	0,025005405	6,895904195	45,42182251	SEMA6 A;
Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903670)	0,001378468	0,025005405	6,895904195	45,42182251	ITGA5;
Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903670)	0,001378468	0,025005405	6,895904195	45,42182251	KLF4;
Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903670)	0,001378468	0,025005405	6,895904195	45,42182251	DLL1;
Regulation Of Sprouting Angiogenesis (GO:1903670)	0,001378468	0,025005405	6,895904195	45,42182251	FGF2
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	PID1;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	CNOT6L ;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	INSR;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	PTEN;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	TGFA;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	HMGA2;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	SOX11;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	FGF2;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	DLL1;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	TGFBR1 ;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	FOXP1;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	IGF1R;

Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	SDCBP;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	CCND2;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	PDCD10;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	ERBB4;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	SSR1;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	AQP11;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	ITGAV;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	STX3;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	FAM98A ;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	TOX;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	ZFPM2;
Positive Regulation Of Cell Population Proliferation (GO:0008284)	0,001505528	0,02677479	2,051829392	13,33404175	FGFR1
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	TRIM71;
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	RAB14;
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	FLRT3;
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	SHOC2;
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	FGF2;
Cellular Response To Fibroblast Growth Factor Stimulus (GO:0044344)	0,002660601	0,039560084	4,73290867	28,06237741	FGFR1
Positive Regulation Of Vascular Endothelial Cell Proliferation (GO:1905564)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	AKT3;
Positive Regulation Of Vascular Endothelial Cell Proliferation (GO:1905564)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	FGF2;
Positive Regulation Of Vascular Endothelial Cell Proliferation (GO:1905564)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	FGFR1
pre-miRNA Processing (GO:0031054)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	LIN28B;

pre-miRNA Processing (GO:0031054)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	LIN28A;
pre-miRNA Processing (GO:0031054)	0,003037184	0,042164168	12,83399209	74,3964011	DICER1

Tabela suplementar 8. Análise da função molecular do *scaffold* endotelizado com células musculares lisas versus controle (célula-tronco indiferenciadas) - na base de dados GO Cell Type

Term	P-value	Adjusted P-value	Old P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PID1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SPARC;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GOLT1B;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SERPINE1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	HDLBP;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PLOD1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FGF2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LOXL2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CDH6;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LACTB;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	POFUT2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TUBB6;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ALCAM;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TFG;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CDH2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PLS3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PTGFRN;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TMSB10;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	POSTN;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	IGFBP4;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ACTN1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	APLP2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FND3B;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ARID5B;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PDIA6;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ADAM19;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RAB32;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LOX;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	WDFY1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	KDELR2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MXRA7;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	IL6ST;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RAI14;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TTYH3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SAR1A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FAM114A1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SHC1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LYPD1;

SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	STC1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TWF1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	HSP90B1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LDHA;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FUT8;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ZMAT3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CALD1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ARSJ;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	STC2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ABL1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PGK1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ST3GAL1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MYH10;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SLC38A2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SOC55;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ABCA1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TGFB2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SMAD3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SMURF2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	BDNF;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PLK2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GFPT2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TMEM132A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GFPT1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FN1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LIF;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MICAL2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ARHGAP29;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	INHBA;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ZFH4;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FOSL2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL1A1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	EHD2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	IL6;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL1A2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	P4HA1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL5A1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	P4HA2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RPL27A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL5A2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CALU;

SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	NF2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FERMT2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LRP12;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FBN1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ITGB1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ARF4;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	NRP1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CLIC4;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MCFD2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	WDR1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DIRAS2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DOCK7;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TRAM2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RND3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MRC2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GYS1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GLIPR1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	C1QTNF1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ZMYM4;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	BDKRB2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PGM3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TNKS1BP1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RIOK2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ITGAV;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	EDIL3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	C11ORF24;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TGIF1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	EIF5A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PTGIS;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	HEG1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MMP2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RRAS2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	AP3B1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	C6ORF62;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	NAV1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	OSMR;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TGFBR2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ENAH;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RCN3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GREM1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CTTN;

SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ASPH;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL6A2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PXDN;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CDH11;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PLIN3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ITGA5;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SYNC;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	BCAT1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DBN1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RAB1A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RALA;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SEC23A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LRRC17;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PTGS2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	THBS2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FSTL1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	THBS1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PTGS1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DRAM1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CD59;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	IGF2BP2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	PDLIM5;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GPC6;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	CSNK1A1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GALNT2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	TXNRD1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	YIPF5;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	LHFPL2;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DEF8;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	GTF2H5;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ARCN1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FKBP1A;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	COL3A1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MARCKS;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	MYO1B;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	KLHL5;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	FAP;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	NFIB;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	AXL;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	DLC1;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	NEDD4;

SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	RAB13;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ATP13A3;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	SEC24D;
SmoothMuscle	5,00E-12	1,05E-10	0	2,108804	54,87256	ASB1
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	CNTFR;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COLGALT2;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	KCNA1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COL12A1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	FAIM2;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	MRC2;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	PTCHD1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	CTSK;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	ARSJ;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	RSPO3;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	FAM43B;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	CCBE1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	PDGFRA;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	POSTN;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	LIF;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	CCK;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	GDF6;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	ASPN;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	SHISA6;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	GREM1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COL1A1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COL3A1;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COL1A2;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	LMX1A;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	COL8A2;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	ACKR4;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	PI15;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	CBLN3;
Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	ITM2A;

Stromal cells in Muscle	0,273923	0,999996	0	1,169119	1,513901	SLC28A1
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	GABRB1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PLEKHB1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	FMN2;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	TMEM92;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ALCAM;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CDH2;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CHL1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	MPZ;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	INSC;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PRX;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ITGB8;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	FGFBP3;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PPFIA3;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PRIMA1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	FOXD3;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	TMEM178B;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	KCNH8;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SORCS1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	POU3F1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ANO4;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SOX10;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SRCIN1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ANO3;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	RAB36;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	RFX4;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SFRP5;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ASPA;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	BRSK2;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CNP;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	DHH;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	EIF5A2;

Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CYP19A1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	TTBK1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PARD6B;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	EXTL1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	FLRT3;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	RDH10;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SEC14L5;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	GPR158;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	BEND6;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	OPCML;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	TFAP2A;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	TFAP2B;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	RCVRN;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CADM4;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	CADM1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	B3GAT1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	L1CAM;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	KIAA1755;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PPP2R2B;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	PLP1;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	SCN2A;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	MDGA2;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	ZBTB8B;
Schwann cells in Muscle	0,29227	0,999996	0	1,106447	1,361016	MEGF9
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	SEMA5B;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	TAGLN;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	TMEM151B;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	PDE1B;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	RRAD;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	NDUFA4L2;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	ADRA1D;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	KCNA5;

Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	CACNA1C;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	SLC7A11;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	SLC6A1;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	RERG;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	FOXS1;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	RBPM52;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	B4GALNT1;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	SLIT3;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	GPC6;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	LEFTY2;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	CORIN;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	RNF43;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	ANGPT2;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	RASL10B;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	PAWR;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	WDR72;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	DAAM2;
Smooth muscle cells in Muscle	0,734044	0,999996	0	0,887131	0,274289	MAPT
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	SEMA5A;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PHLDB1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PCDHGB7;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	SPARC;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	LMOD1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	LDB2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FGF1;

Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ANTXR1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FGF2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	TSPAN11;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	RGS4;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	TMEM47;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	GJA1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	DPYSL3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	EDIL3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PDGFRA;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	POSTN;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	SCARA3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	IGFBP5;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	MMP2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	BGN;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ANK2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	DKK3;

Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	CLIP3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	MAP1B;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	CDH11;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ANGPTL2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	TLN2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PDZRN3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	NTM;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL11A1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PLPPR4;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PRICKLE2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	THY1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	THBS2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PCDH18;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FSTL1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FRZB;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	SPOCK1;

Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	SLIT3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ZNF423;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	OPCML;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	RUNX1T1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	CADM3;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	PRRX1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ADAM33;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL1A1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	MFAP4;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL3A1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	NFASC;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL1A2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	CXCL12;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL5A1;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	COL5A2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	DZIP1;

Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	ADGRL4;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FBXL7;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FERMT2;
Mesenchymal Stromal cell:Blood Vessel	2,19E-10	7,13E-09	0	3,613302	80,35915	FBN1
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	OLFML2B;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	SPARC;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	HSPB6;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ELN;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	HSPB7;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	LMOD1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	LDB2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	LRRC32;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	MEDAG;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ADAMTS5;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ADAMTS2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	SGCD;

Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ADGRA2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ENPP2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	TNS1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ZCCHC24;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	PDGFRA;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	POSTN;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	MMP2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	BGN;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	DDIT3;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	DAAM2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL6A2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	CDH11;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ANGPTL2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL15A1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	TAGLN;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	LRP1;

Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	NTM;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL11A1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	CACNA1C;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	THY1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	NID1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	THBS2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	PCDH18;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	CALD1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	FRZB;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	PRRX1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ADAM33;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL1A1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	MFAP4;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL3A1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL1A2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	CXCL12;

Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL5A1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	FAP;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	COL5A2;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	DCHS1;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	ADGRL4;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	FMOD;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	FBXL7;
Vascular Smooth Muscle cell:Embryonic Stem Cell	7,20E-07	7,37E-06	0	2,715492	38,40699	FBN1
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	PHLDB1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	TAGLN;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	SPARC;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	HSPB6;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL12A1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	SERPINE1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	THY1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	THBS2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	ANTXR1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	FSTL1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	LOXL2;

Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	MEDAG;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	NT5E;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	C1QTNF1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	CALD1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	TIMP3;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	EDIL3;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	TNS2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	PDGFRA;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	POSTN;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	PRRX1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	IGFBP4;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	CAV1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	HEG1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	MMP2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	CRIM1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	FN1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	BGN;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	EMP1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	DKK3;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL1A1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	EHD2;

Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL3A1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL1A2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	LOX;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL5A1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	FAP;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	AXL;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	COL5A2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	CDH11;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	PLSCR4;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	RHOJ;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	ANGPTL2;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	CSPG4;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	ADGRL4;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	FBXL7;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	FBN1;
Mesenchymal Progenitor cell:Muscle	1,12E-05	9,17E-05	0	2,453551	27,95962	ENG
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ITGB1;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	NGFR;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	TFRC;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	THY1;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	NT5E;

Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ALCAM;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ANPEP;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	CASP3;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ERBB2;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	KIT;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	PECAM1;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ITGAV;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	NCAM1;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ITGA5;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	CD34;
Mesenchymal Stem cell:Muscle	1,22E-04	7,71E-04	0	4,995622	45,00116	ENG
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	CDH5;
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	NOS3;
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	KDR;
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	PECAM1;
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	NCAM1;
Endothelial cell:Muscle	0,002907	0,013185	0	14,96801	87,42219	CD34
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL15A1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	TAGLN;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	SPARC;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	HSPB6;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ELN;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	SYNPO2;

Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	HSPB7;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	LMOD1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	LRRC32;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	THBS2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	PCDH18;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	MYLK;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	MEDAG;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ADAMTS5;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	FGF7;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ADAMTS2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	SGCD;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	SLIT3;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	VSTM4;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	PDGFRA;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	POSTN;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	PRRX1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	MMP2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ITGA1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	BGN;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ADAM33;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ASPN;

Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL1A1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	MFAP4;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL3A1;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL1A2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	CXCL12;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	FAP;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL6A2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	COL5A2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	CDH11;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	RHOJ;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ANGPTL2;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	ADGRL4;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	FMOD;
Smooth Muscle cell:Blood Vessel	0,005261	0,022192	0	1,737166	9,115574	FBN1
Mesenchymal Stem cell:Embryonic Stem Cell	0,0259	0,088012	0	9,975188	36,44437	NT5E;
Mesenchymal Stem cell:Embryonic Stem Cell	0,0259	0,088012	0	9,975188	36,44437	THY1;
Mesenchymal Stem cell:Embryonic Stem Cell	0,0259	0,088012	0	9,975188	36,44437	CD34;
Mesenchymal Stem cell:Embryonic Stem Cell	0,0259	0,088012	0	9,975188	36,44437	VSTM4;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	CASP3;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	KIT;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	KDR;

Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	CSPG4;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	NANOG;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	NCAM1;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	THY1;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	CD34;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	FUT4;
Stem cell:Muscle	0,035314	0,116709	0	2,49484	8,341434	RUNX1

Atividades científicas

Produção bibliográfica durante o doutorado

1. SECONDO, STM; **RODRIGUES, LS**; RAMOS, L. P. M.; BOVALATO, A. L. C.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, D. N.; SOBREIRA, M. L.; MORAES, M. P. T.; BERTANHA, M. Evaluation of Biointegration and Inflammatory Response to Blood Vessels Produced by Tissue Engineering—Experimental Model in Rabbits. *BIOMOLECULES*. , v.12, p.1776 - , 2022.

2. PIOVESANA, R. T.; **RODRIGUES, L. S.**; BOVALATO, A. L. C.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, D. N.; RINALDI, J. C.; SANTOS, N. J.; MORI, J. C.; LOURENCAO, P. L. T. A.; BIRCH, L.; BERTANHA, M.

Urinary Bladder Patch Made with Decellularized Vein Scaffold Seeded with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Model in Rabbits. *Biomedicines*. , v.10, p.2814 - , 2022.

3. **RODRIGUES, LENIZE DA SILVA**; BERTANHA, MATHEUS; EL DIB, REGINA; MOURA, REGINA

Association between deep vein thrombosis and stent patency in symptomatic iliac vein compression syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Vascular Surgery-Venous and Lymphatic Disorders*. , v.9, p.275 - 284, 2021.

4. BERTANHA, MATHEUS; **RODRIGUES, LENIZE DA SILVA**; MELLUCCI FILHO, PEDRO LUCIANO; MOROZ, ANDREI; PARDINI, MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS; SOBREIRA, MARCONE LIMA; DURIGON, EDISON LUIZ; MACHADO, RAFAEL RAHAL GUARAGNA; GROTO, REJANE MARIA TOMMASINI; LIMA, MARCELO ANDRADE DE; NADER, HELENA BONCIANI; MORAES, MARLI LEITE DE; BARBOSA, ALEXANDRE NAIME; MEDOLAGO, NATÁLIA BRONZATTO; CARDOSO, FÁBIO FLORENÇA; MAGRO, ANGELO JOSÉ; CARVALHO, CRISTIANE RODRIGUES GUZZO; MORAES, LEONARDO NAZÁRIO DE; ALVARADO, RITA DE CÁSSIA; NUNES, HELGA CAPUTO; CAMPOS, GUSTAVO CONSTANTINO DE; GRILLO, VINICIUS TADEU RAMOS DA SILVA; SERTORIO, NATHALIA DIAS; FORTALEZA, CARLOS MAGNO CASTELO BRANCO
Nebulized enriched heparin to treat no critical patients with Sars-Cov-2. *MEDICINE (BALTIMORE)*. , v.100, p.e28288 - , 2021.

5. **RODRIGUES, L. S.**; BOVALATO, A. L. C.; SILVA, B. E.; CHIZZOLINI, L. V.; CRUZ, B. L.; MORAES, M. P. T.; LOURENCAO, P. L. T. A.; BERTANHA, M.

Quantification of adhesion of mesenchymal stem cells spread on decellularized vein scaffold. *Acta Cirurgica Brasileira*. , v.36, p.e361001 - , 2021.

****está publicação é referente a parte dos resultados do doutorado***

6. BERTANHA M., Mellucci Filho PL., Genka CA, Camargo PAB, Grillo VTRS, Sertório ND, **Rodrigues LS**, Sobreira ML, Lourenção PLTA . Quantitative analysis validation for sclerotherapy treatment of lower limb telangiectasias. Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders, 2023.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CRUZ, B. L.; RODRIGUES, L. S.; BERTANHA, M. Utilização da engenharia celular para caracterização e diferenciação de CTM em músculo liso- *in vitro* In: XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2020, São Paulo. Anais do XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. , 2020. v.32.

6. MIRANDA, LEANDRO PEREIRA; **RODRIGUES, LENIZE DA SILVA**; DEFFUNE, ELENICE; SOBREIRA, MARCONE LIMA; BERTANHA, MATHEUS
Evaluation of biological integration and inflammatory response to blood vessels produced by tissue engineering. REVISTA DE MEDICINA (SÃO PAULO. ONLINE). , v.98, p.4 - 4, 2019.

Capítulos de livros publicados

1. BERTANHA, M.; **RODRIGUES, LS**; MARTINS, G. L.; BARUD, H.
Tratamento e avaliação de úlceras arteriais In: Feridas: Um desafio para saúde pública. Vol II: o apoio das técnicas fotoônicas. 2 ed. São Carlos: São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2022, v.2, p. 31-34.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **RODRIGUES, LS**; BERTANHA, M. **Protótipo para engenharia de tecidos em vasos sanguíneos-Modelo em coelho, In Vitro. 2022.**, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

2. SERTORIO, N. D.; GENKA, C. A.; CAMARGO, P. A. B.; GRILLO, V. T. R. S.; MELLUCCI FILHO, P. L.; **RODRIGUES, L. S.**; LOURENCAO, P. L. T. A.; BERTANHA, M. **Validação de método de Avaliação Quantitativa da Eficácia de Tratamento de Telangiectasias. 2022**, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

3. **RODRIGUES, L. S.**; BERTANHA, M. **Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos em coelhos - modelo in vitro**, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. **RODRIGUES, L. S.**; BOVOLATO, A. L. C.; DEFFUNE, E.; BERTANHA, M. **Tissue engineering of blood vessels in rabbits - Model in vitro**, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

5. CHAPARRO, E. A.; ROCHA, A.L.V.; GIMENES, F.G.; RISSO, M.; BOVOLATO, A. L. C.; COTRIM, O.S.; RODRIGUES, L. S.; BERTANHA, M.; SHIGUEMATSU, A.; DEFFUNE, E. **Soro Autólogo de uso ocular (SAUOC): enfoque em medicina personalizada.**, 2019. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Patente

BERTANHA, M.; DURIGON, E. L.; SOBREIRA, M. L.; MOROZ, A.; PARDINI, M. I. M. C.; RODRIGUES, L. S.; MACHADO, R. R. G. 'Composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral', 2020. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020200119648. Data de depósito: 15/06/2020. Depositante/Titular: Matheus Bertanha. Depositante/Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

'SysBio-M - Sistema de monitoramento multiparamétrico para biorreatores', 2019, Brasil Instituição de Registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Número do Registro: BR512020000772-4. Data de depósito: 01/12/2019, Data da concessão: 01/12/2019. Finalidade: sistema de monitoramento multiparamétrico para biorreatores.

Prêmios e títulos

- | | |
|-------------|---|
| 2021 | Caracterização de diferenciação de células-tronco mesenquimais em músculo liso por meio da engenharia celular - <i>IN VITRO</i> . XIX Congresso Médico Acadêmico de Botucatu - 2º lugar |
| 2019 | Evaluation of biological integration and inflammatory response to blood vessels produced by tissue engineering experimental model in rabbit, 2º. Lugar do Prêmio Oswaldo Cruz - Cirúrgico, Scientific Awards of the XXXVIII Congresso Médico Universitário da FMUSP |
| 2018 | Avaliação de biointegração de vasos sanguíneos produzidos por engenharia de tecidos, III Simvasc 2018 - 2º Lugar melhor trabalho apresentado na Sessão de Temas Livres. |