

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA

**Regulação das células mesenquimais da matriz do cordão
umbilical canino durante a osteogênese**

João Paulo Ignácio Gonzaga
Médico Veterinário

Araçatuba – SP
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA**

**Regulação das células mesenquimais da matriz do
cordão umbilical canino durante a osteogênese**

João Paulo Ignácio Gonzaga

Orientadora: Prof^a. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP

2017

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Gonzaga, João Paulo Ignácio

G642r

Regulação das células mesenquimais da matriz do cordão umbilical canino durante a osteogênese / João Paulo Ignácio Gonzaga.
Araçatuba: [s.n], 2017.
46 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientadora: Profª. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

1. Cães. 2 .Expressão gênica. 3. Células mesenquimais estromal - cães.
4. Diferenciação celular 5. MicroRNAs I. T.

CDD 636.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Regulação das células mesenquimais da matriz do cordão umbilical canino durante a
osteogênese

AUTOR: JOÃO PAULO IGNACIO GONZAGA

ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA

Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium - UniSALESIANO de Araçatuba

Araçatuba, 07 de agosto de 2017.

CURRICULARES DO AUTOR

João Paulo Ignácio Gonzaga - Nascido em 17 de janeiro de 1991, na cidade de Jales – SP. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Júlio de Mesquita Filho - (UNESP) – Araçatuba - SP, em 2013. Ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal em março de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que procuraram o avanço da pesquisa na Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me oferecer saúde e proteção, me suprir de oportunidades de alcançar o conhecimento e iluminar meus passos por onde eu caminhar.

Ao meu filho Inácio, motivação para todo o meu caminhar e viver, minha fonte de amor, carinho e energia para segui o caminho da vida. Por me mostra o quanto é importante o significado da palavra responsabilidade e amor.

À minha esposa Danielle, companheira em todos os momento, amor e melhor amiga. Por estar sempre presente ao lado me dando estímulo para seguir em frente nos momentos mais delicados, suporte e carinho.

Aos meus pais, Paulo e Dirce, pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo e por não medirem esforços para me oferecer o melhor para que chegasse até aqui.

À minhas irmãs Natália e Marina pelos incentivos, apoio e carinho.

Aos meus familiares que de forma direta ou indireta me deram suporte e torceram pelo meu sucesso.

À minha orientadora Profa. Tereza Cristina Cardoso Silva, pela oportunidade de orientação, por toda confiança e ajuda, por ter se tornado tão especial na realização deste sonho.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL,
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, CAMPUS DE ARAÇATUBA COM
O APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE
NÍVEL SUPERIOR (CAPES) PELO SUPORTE FINANCEIRO PARA A
REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

SUMÁRIO	Pág
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 Introdução	1
1.1 Osteogênese	4
1.2 Células tronco mesenquimais	6
1.3 Micro RNA	7
2 Hipótese	8
3 Objetivo	8
3.1 Gerais	8
3.2 Específicos	9
4 Referências	9
 CAPÍTULO 2 – REGULATION OF MESENCHYMAL CELLS OF THE CANINE UMBILICAL CORD MATRIX DURING OSTEOGENESIS	 14
1 Introduction	15
2 Materials and Methods	16
3 Results.....	18
4 Discussion.....	20
5 Conclusions	25

6 References..... 26

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 Esquema da biogênese e atuação do mRNA.

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 Morphology of canine MSCs (cMSCs) isolated from Wharton's jelly closely resembled MSC-like cells (A and C). Micrographs were captured under phase contrast microscopy. After osteogenic differentiation, cMSCs transfected with mimic miR-106b (B) and by inhibitor miR-106b (D) following Von Kossa's staining. Scale bars 20 μ m.

FIGURE 2 Fold change presented as the mean $\pm$ SD (n=3 for all experiments). miR-106b expression in undifferentiated and osteoinduced cMSCs (A) at 0, 7, 14 and 21 days of observation. miR-106b expression in undifferentiated cells, cells transfected with a mimic of miR-106b, and cells with an inhibitor of miR-106b (B).

FIGURE 3 Relative alkaline phosphatase (ALP) activity. Untransfected cMSCs and miR-106b mimic transfected cells showed a significant difference in activity after 21 days after osteoinduction ($p < 0.05$). The same results were obtained when cMSCs were transfected with a miR-106b inhibitor (B). Data were obtained from three consecutive experiments.

FIGURE 4 Alizarin Red staining showing extracellular matrix deposition and mineralization of cMSCs subjected to osteodifferentiation without

miR-106b transfection (A), cMSCs transfected with a mimic of miR-106b (B) and an inhibitor (C). Bar 40 μm .

FIGURE 5 Relative mRNA expression of osteoblast-related genes osteocalcin (A), osteopontin (B) and *RUNX2* (C) at 0, 7, 14 and 21 days, assayed by qRT-PCR. The gene expression was normalized using GAPDH expression for cMSCs (not transfected), transfected cMSCs with a mimic of miR-106b, and those transfected with an inhibitor. Data of fold change are presented as the mean $\pm$ SD ($p < 0.005$) in three consecutive experiments.

REGULAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MATRIZ DO CORDÃO UMBILICAL CANINO DURANTE A OSTEOGÊNESE

RESUMO – As células mesenquimais derivadas da geleia de Wharton isoladas da matriz do cordão umbilical canino tem sido sugeridas como uma fonte promissora de MSCs para serem usadas nas aplicações clínicas em ciência veterinária, como uma ferramenta potencialmente efetiva na regeneração óssea. MicroRNA (miARN) é um regulador pós-transcricional da expressão gênica em várias condições fisiológicas, incluindo a osteogênese. Neste estudo, as MSCs caninos (cMSCs) isoladas da geleia de Wharton foram induzidos a osteogênese e a transcrição de miR-106b foi avaliada em 0, 7, 14 e 21 dias após a indução. Em outro experimento, as cMSC foram transfectadas com um imitador de miR-106b e um inibidor e induzidos a osteogênese. Morfologicamente, cMSCs transfectadas com um inibidor de miR-106b produziram células semelhantes a osteócitos quando comparadas às mesmas células transfectadas com o mímico de miR-106b. cMSCs apresentaram transcrição de miR-106b após 7 dias de osteoindução em um nível baixo em comparação com o controle positivo, enquanto as células transfectadas com o mímico de miR-106b mostraram que o miR-106b deveria ser regulado positivamente. Após a inibição da expressão de miR-106b em cMSCs osteoinduzidas, a atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi aumentada. A transcrição do mRNA de osteocalcina, osteopontina e RUNX2 foi regulada positivamente aos 21 dias após a osteoindução, após a inibição de miR-106b. Esses achados, pela primeira vez, mostraram que a expressão de miR-106b regula negativamente a osteogênese em MSCs caninos derivados da geleia de Wharton e parece interferir na diferenciação celular.

Palavras-chave: Cães, expressão gênica, células mesenquimais estromal – cães, diferenciação celular, microRNAs.

REGULATION OF MESENCHYMAL CELLS OF THE CANINE UMBILICAL CORD MATRIX DURING OSTEOGENESIS

SUMMARY – Wharton`s jelly derived-MSCs isolated from canine umbilical cord matrix have been suggested as a promising source of MSCs to be used for clinical applications in veterinary science, as a potentially effective tool in bone regeneration. MicroRNA (miRNA) is a post-transcriptional regulator of gene expression in several physiological conditions, including osteogenesis. In this study, canine MSCs (cMSCs) isolated from Wharton`s jelly were induced to osteogenesis and miR-106b transcription was measured at 0, 7, 14 and 21 days following induction. In another experiment, cMSCs were transfected with a miR-106b mimic and an inhibitor and induced to osteogenesis. Morphologically, cMSCs transfected with an inhibitor of miR-106b appeared as osteocyte-like cells when compared to the same cells transfected with the mimic of miR-106b. cMSCs showed miR-106b transcription after 7 days of osteoinduction was at a low level compared to the positive control, whereas transfected cells with the miR-106b mimic showed miR-106b to be upregulated. After inhibition of miR-106b expression in osteoinduced cMSCs, alkaline phosphatase (ALP) activity was increased. Osteocalcin, osteopontin and *RUNX2* mRNA transcription were upregulated at 21 days after osteoinduction following miR-106b inhibition. These findings have, for the first time, shown that the expression of miR-106b negatively regulates osteogenesis in canine MSCs derived from Wharton`s jelly and seems to interfere with cell differentiation.

Keywords: Dogs, gene expression, stromal mesenchymal cells - dogs, cell differentiation, microRNAs.

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Diariamente maior número de pessoas e animais sofre afecções ósseas e necessitam de intervenções cirúrgicas, onde os grandes defeitos ósseos representam os maiores desafios para os cirurgiões (LORO, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Da engenharia tecidual vem emergindo alternativas estratégicas para a regeneração óssea. Três componentes têm sido postulados como essenciais: isolamento e expansão de osteoprogenitores ou células-tronco, presença de fatores osteoindutores apropriados e um meio que mimetize um ambiente propício para a regeneração óssea (HANDSCHEL et al., 2010; PARTRIDGE et al., 2002). Os fatores de crescimento representam um dos elementos chave em combinação com células osteoprogenitoras, e estabilização mecânica (DEVESCOVI et al., 2008).

Inúmeros materiais biológicos têm sido testados para minimizar esses problemas, sendo alguns utilizados para corrigir defeitos ósseos e outros para recobrir implantes. Suas capacidades osteoindutoras e/ou osteocondutoras vêm sendo avaliadas. Materiais autólogos ou homólogos frescos e/ou preservados representam uma alternativa com baixo custo, fácil execução e praticidade de uso clínico (CARLO et al., 2007; SILVA et al., 2003; SOUZA et al., 2011).

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é rica em proteínas ósseas morfogenéticas com alto potencial osteoindutor *in vivo*. O uso de enxertos ósseos homólogos mineralizados e desmineralizados produz resultados similares, embora o padrão do primeiro seja osteocondutor, enquanto o segundo é considerado osteoindutor (SILVA et al., 2003).

O plasma rico em plaquetas (PRP) autógeno consiste em uma concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido a partir da centrifugação de sangue total. Tem sido utilizado na prática clínica por estimular a cicatrização óssea numa variedade de situações, sob alegação de

conter uma elevada concentração de fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF, fator de crescimento transformados beta – TGF β , fator de crescimento semelhante a insulina - IGF). Ainda, estão presentes proteínas osteocondutoras (fibrina, fibronectina e vitronectina), que servem de matriz para migração celular, favorecendo a osteocondução, a epitelização e a osteointegração (HENDERSON et al., 2003; OBARRIO et al., 2000; PRADEEP et al., 2009; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2011).

Estudos comparativos vêm demonstrando que a utilização do PRP, associada ou não a outros tipos de enxerto, abrevia o tempo requerido para cicatrização óssea, com intensa neoformação óssea, maior invasão vascular e melhor remodelamento do enxerto (GERARD et al., 2007; PRADEEP et al., 2009; SANCHEZ et al., 2003; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2011; WILSON et al., 2006).

Células osteoprogenitoras e células-tronco da medula óssea foram marcadas com anticorpos de receptores de membrana para PDGFs e TGF- β , confirmando assim, serem fatores que possuem ação direta na reparação do tecido ósseo (MARX et al., 1998). Além disso, foi observado uma maior imunomarcagem de PDGF-B e TGF- β nos focos de fratura de cães tratados com PRP (SOUZA et al., 2012).

Estudos preliminares *in vitro* vêm sendo realizados na medicina e odontologia humanas na tentativa de determinar a real ação dos fatores de crescimento na diferenciação de células mesenquimais em células ósseas (SHAN et al., 2009), bem como na mitogênese de osteoblastos e células do ligamento periodontal (MARKOPOULOU et al., 2009; OKUDA et al., 2003; PAPADOPOULOS et al., 2003).

Células mesenquimais indiferenciadas podem ser embrionárias, do cordão umbilical e da medula óssea (células adultas). Todas são pluripotentes, entretanto sua capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação diminui com a idade, o que valoriza o uso de células embriogênicas por sua potencialidade e alta capacidade em fornecer células osteoprogenitoras e osteoblastos de forma ilimitada (HANDSCHEL et al., 2006). Entretanto as células

do cordão umbilical mostraram-se uma alternativa promissora em substituição às células embrionárias no que se refere à regeneração óssea (HANDSCHEL et al., 2010).

Estudos experimentais em cães mostraram reparação óssea mais rápida quando utilizado células da medula óssea em osteotomias do rádio (OLIVEIRA et al., 2010). *In vitro* as células da medula óssea humana demonstraram osteogênese na presença e ausência de meios osteoindutores comerciais (LORO, 2009), e as células do cordão umbilical canino mostraram-se pluripotentes (VIEIRA et al., 2009).

Dessa forma, a regulação da osteogênese pode estar relacionada a fatores epigenéticos que influenciam essa resposta óssea a injúrias e cirurgias. Os miRNAs regulam a tradução e a estabilidade do mRNA no citoplasma, sabe-se que no homem existem cerca de 1000 miRNAs codificado no genoma humano, assim, os miRNAs parecem participar de praticamente todos os processos celulares e as mudanças na expressão deles estão presentes em patologias (VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006; NILSEN, 2007; FARAZI et al., 2011). O MiR-106b (miR-106b-5p) é um membro do cluster miR-106b-25, agrupado com MiRs 93-25 e hospedado no intron 13 do MCM7 no cromossomo 7q22 (Ni et al., 2014), estudos sugeriram que ele desempenha um papel fundamental na resposta imune e formação de tumores (Li et al., 2016).

MiRNAs têm importantes papéis regulatórios na proliferação, diferenciação e função de osteócitos, bem como nas doenças associadas aos ossos, como a osteoporose (ELL et al., 2014). Estudos de acumulação demonstraram que as mutações e polimorfismos de miRNA afetaram locais de ligação ocasionando desregulação da expressão do miRNA, causando a osteoporose (BAE et al., 2012; LI et al., 2016; Wang et al., 2013) identificaram que o miR-214 foi inversamente correlacionado com a formação óssea, visando ativar a transcrição do fator 4 (ATF4), um fator de transcrição crucial durante diferenciação osteoblástica (Wang et al., 2013). Essas evidências sugerem que

os miRNAs têm um papel crucial na regulação do complexo processo de formação osteoblástica, formação óssea e osteoclastogênese, sendo então importante estudar os miRNAs pois estes podem fornecer informações sobre estratégia anabólicas para se entender as doenças. Dessa forma, estudos sobre os miRNAs demonstram sua aplicabilidade na medicina veterinária e no entendimento de processos importantes como a osteogênese.

1.1 Osteogênese

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos. Osteoblastos São células mononucleadas, de origem mesenquimal, que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São cubóides ou ligeiramente alongadas e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada (osteóide). São as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso bem como pela sua mineralização (MACKIE, 2003; CERRI, 2005). Quando ativas, possuem um citoplasma rico em organelas de síntese e secreção, como retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi desenvolvidos, grânulos de secreção, mitocôndrias, vesículas de transporte, vesículas endossômicas, lisossoma, além das proteínas do citoesqueleto (KATCHBURIAN, 2004; RODAN, 1998). Sintetizam a matriz orgânica, constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas.

Osteoblastos e pré-osteoblastos exibem níveis elevados da enzima fosfatase alcalina na superfície de suas membranas citoplasmáticas, a qual, quando liberada, contribui para o início da mineralização e o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita (MUNDY, 1991; KATCHBURIAN, 2002; CERRI, 2002). No processo inicial de formação do tecido ósseo, os osteoblastos,

após secretarem a primeira camada de matriz orgânica, parecem assumir um importante papel na sua mineralização. A partir dos osteoblastos adjacentes à matriz orgânica óssea recentemente sintetizada, brotam pequenas vesículas de sua superfície. Estas vesículas desprendem-se dos osteoblastos e, portanto, são observadas entre os constituintes orgânicos da matriz óssea. Assim, são estruturas arredondadas, que se originam da membrana plasmática dos osteoblastos, sendo denominadas de vesículas da matriz (KATCHBURIAN; CERRI, 2002). Estas vesículas, que permanecem na matriz extracelular totalmente dissociadas das células, contêm glicoproteínas e exibem forte marcação em sua membrana para a fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma família de enzimas que hidrolisam os íons fosfatos, fornecendo-os para o interior das vesículas. Ocorre, também, um aumento da concentração de íons cálcio no interior dessas vesículas, provavelmente através dos fosfolipídios em suas membranas. Sendo assim, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio, resultando na precipitação de fosfato de cálcio no interior das vesículas. Posteriormente, ocorre o rompimento da membrana das vesículas e a mineralização espalha-se pela matriz. Este processo é característico dos locais onde está ocorrendo pela primeira vez a formação e mineralização do tecido ósseo (KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

Deve-se ressaltar que as vesículas da matriz também são liberadas pelos condrócitos durante a mineralização da cartilagem, bem como pelos odontoblastos, durante a formação da primeira camada de dentina (ANDERSON, 1969). Os osteoblastos também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios, como o da tireóide, da paratireóide (PTH), estrogênios, glicocorticóides, insulina, Vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D3). Secretam fatores de regulação como Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF- β que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica (CATE, 2001; RAISZ; RODAN, 1998).

Em condições fisiológicas, a apoptose de osteoblastos parece exercer um importante papel no controle do crescimento ósseo (PALUMBO; FERRETTI; DE,

2003). A apoptose é um mecanismo de morte celular, sendo, portanto, responsável pelo equilíbrio populacional de células nos tecidos e em órgãos. A apoptose, quando desencadeada, ativa uma complexa cascata proteolítica intracelular que coordena todo o processo de morte celular. Como consequência da ativação das proteínas intracelulares promotoras da apoptose, a célula fragmenta-se originando os corpos apoptóticos.

Os corpos apoptóticos expressam em sua membrana plasmática, entre outras moléculas, a fosfatidilserina que atrai os fagócitos e estes rapidamente internalizam os corpos apoptóticos. Recentemente, foi mostrado que os osteoblastos, além de participar na formação e mineralização da matriz óssea, podem também fagocitar os corpos apoptóticos oriundos de osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo, durante o início da formação óssea (CERRI, 2005).

1.2 Células tronco mesenquimais

As MSCs podem ser isoladas por vários métodos, sendo o mais frequente o gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares. As células mononucleares isoladas são cultivadas com meio contendo soro fetal, sendo que as MSCs aderem ao plástico. Algumas células da linhagem hematopoética também podem aderir, mas, com o tempo, com as várias trocas do meio de cultura, são removidas. Portanto, enquanto este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes, a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens e, após determinado número delas, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova.

As MSCs são fibroblastoides, com formato fusiforme. Após um lag inicial, as células se dividem rapidamente. Durante seu crescimento inicial in vitro, formam colônias denominadas, em analogia com as células-tronco hematopoéticas, de colônia formadora de unidades de fibroblastos (CFU-f). Apesar de não serem imortais, as MSCs têm a capacidade de se expandir

numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, com um tempo de duplicação que depende do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial. De fato, a densidade de semeadura é um parâmetro crítico para assegurar uma boa taxa de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação das MSCs. Alguns pesquisadores demonstraram que, para algumas culturas, há necessidade de iniciá-las com uma densidade muito baixa (SERGIO; BYDLOWSKI, 2009).

1.3 miRNA

MicroRNAs (miRNAs) são classes de genes de RNA não codificantes cujo produto final é uma molécula de ARN funcional de 22 nucleotídeos. Eles desempenham papéis importantes na regulação de genes alvo, vinculando-se a regiões complementares de transcrições de mensagens para reprimir sua tradução ou regular a degradação (BARTEL, 2004).

A biogênese das sequências de miARN foi amplamente elucidada (KIM, 2005). O miRNA maduro (frequentemente designado por miR) é processado a partir de uma sequência tronco característica (chamada pré-mir), que pode ser excisada de uma transcrição primária mais longa (ou pri-mir). Apenas poucos desses transcritos primários foram completamente descritos, mas a evidência sugere que os miRNAs são transcritos pela ARN polimerase II.

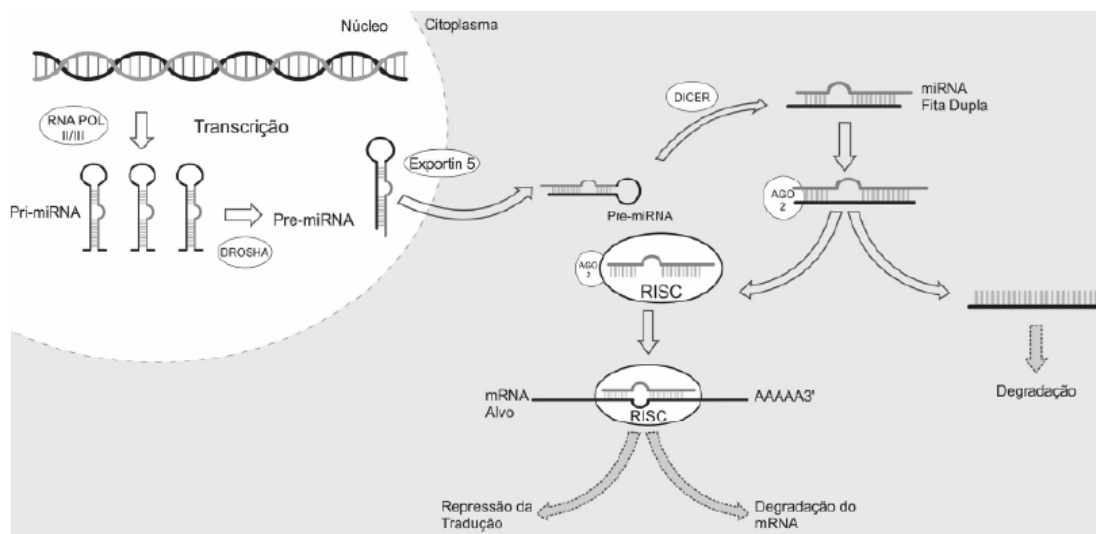


Figura 1 - Esquema da biogênese e atuação dos miRNAs. A enzima RNA polimerase II realiza a transcrição dos microRNAs primários (pri-miRNA). O complexo enzimático *Drosha* cliva os grampões formando precursores do miRNA (pre-miRNA), os quais são carreados ao citoplasma e associados ao complexo *Exportin-5-Ran-GTP-dependent* (*Exportin 5*). No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pelo complexo enzimático *Dicer*, perdendo a configuração em grampo. O miRNA fita-dupla formado associa-se à proteína Argonauta 2 e uma das fitas é acoplada ao complexo de proteínas que reprime a expressão do gene alvo (RISC), enquanto a outra é degradada. O RISC, contendo o microRNA, liga-se ao mRNA-alvo, reprimindo a sua tradução ou promovendo a sua degradação.

2 HIPÓTESE

O miR-106b é expresso em MSCs caninos derivados da geleia de Wharton antes e após a osteoindução. A transfecção de MSC com um imitador e / ou inibidor de miR-106b interfere na mineralização e na expressão de genes osteoblásticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os eventos intrínsecos a osteogênese a partir de células mesenquimais caninas oriundas da geleia de Wharton e a influência do miR106b no processo de mineralização das células e na expressão de genes a elas associados.

3.2 Específicos

Promover a transfecção experimental do imitador e do inibidor do miRNA-106b em células mesenquimais caninas da geleia de Wharton e promover sua diferenciação.

Avaliar a expressão do miRNA 106b em células já induzidas a diferenciação com o imitador e o inibido nos dias 0, 7, 14 ,21.

Avaliar a expressão gênica da osteocalcina, osteopontina e RUNX2 em diferentes momentos da diferenciação, após a transfecção

Avaliar o aumento fosfatase alcalina após a diferenciação e transfecção das células.

5 REFERÊNCIAS

BAE, Y.; YANG, T.; ZENG, H. C. et al. miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. **Hum. Model Genetc.**, v. 21, p. 2991–3000, 2012.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function; **Cell**. v. 116, p. 281–297, 2004.

CANDINI, A. L. **Avaliação do efeito do Plasma Rico em Plaquetas fotoestimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea**. 2001. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós graduação em Bioengenharia, Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

CARDOSO, T. C.; FERRARI, H. F.; GARCIA, A. F. et al. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. **BMC Biotechnol.**, v. 4, p. 12-18, 2012.

CERRI, P. S. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell .Evol. Biol.**, v. 286, p. 833-840, 2012.

DEL PUERTO, H. L.; MARTINS, A. S.; MILSTED, A. et al. Canine distemper virus induces apoptosis in cervical tumor derived cell lines. **Virolog. J.**, v. 8, p. 1-7, 2011.

ELL, B.; KANG, Y. MicroRNAs as regulators of bone homeostasis and bone metastasis. **BoneKey Rep.**, v. 3 p. 549, 2014.

FARAZI, T. A.; SPITZER, J. I.; MOROZOV, P. et al. miRNAs in human cancer. **J. Pathol.**, v. 223, p. 102–115, 2011.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; ANDE, S. R. et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **J. Med. Gen.**, v. 46, p. 497-510, 2009.

GUERCIO, A.; DI BELLA, S.; CASELLA, S. et al. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. **Cell Biol. Int.** v. 9, p. 167-172, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancer.**, v. 53, p. 335-343, 2007.

KATCHBURIAN E. Membrane-bound bodies as initiators of mineralization of dentine. **J. Anat.**, v. 116, p. 285-302, 1973.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 376–385, 2005.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4.ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2007. p. 619-636.

LI, N.; LIU, Y.; MIAO, Y. et al. MicroRNA-106b targets FUT6 to promote cell migration, invasion, and proliferation in human breast cancer. **IUBMB Life**, v. 68, p. 764–775, 2016.

LI, G.; SIMPSON, A. H.; KENWRIGTH, J. et al. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. **J. Orthop. Res.**, v.15, p. 765–72, 2007.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 29, p. 1207-1219, 1999.

MARTINS, D. C.; FERREIRA, A. M. R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Vet.**, v. 31, p. 189-191, 2003.

NILSEN, T. W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. **Trends Genet.**, v. 23, p. 243–249, 2007.

NI, X.; XIA, T.; ZHAO, Y. et al. Downregulation of miR-106b induced breast cancer cell invasion and motility in association with overexpression of matrix metalloproteinase 2. **Cancer Sci.**, v.105, p. 18–25, 2014.

PACICCA, D. M.; PATEL, N.; LEE, C. et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. **Bone**, v. 33, p. 889–898, 2003.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S. et al. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos One**, v. 7, p. 9, 2012.

SEO, M. S.; JEONG, Y. H.; PARK, J. R. et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **J. Vet. Sci.**, v. 10, p. 181-187, 2009.

BYDLOWSKI, P. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n. 1, p. 25-35, 2009.

SCHWARZ, C.; LEICHT, U.; DROSSE, I. et al. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. **Vet. Res. Comm.**, v. 35, p. 487-499, 2011.

TEN CATE, A. R. **Histologia bucal**: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are primitives' stromal cell population. **Stem Cells**, v. 26, p. 591-599, 2008.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study by amniotic fluido, amnion; and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.** v. 78, p. 361-373, 2011.

VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J. et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev.**, v. 20, p. 515–524, 2006.

VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transp.**, v. 19, p. 279-289, 2010.

WANG, X.; GUO, B.; LI, Q. et al., miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. **Nat. Med.**, v. 19 p. 93–100, 2013.

CAPITULO 2: REGULATION OF MESENCHYMAL CELLS OF THE CANINE UMBILICAL CORD MATRIX DURING OSTEOGENESIS

Abstract

Wharton's jelly derived-MSCs isolated from canine umbilical cord matrix have been a promising source of MSCs to be used in bone regeneration. MicroRNA (miRNA) is a post-transcriptional regulator of gene expression during osteogenesis. In this study, cMSCs were induced to osteogenesis and miR-106b transcription was measured at 0, 7, 14 and 21 days following induction. Moreover, cMSCs were transfected with a miR-106b mimic and an inhibitor and induced to osteogenesis. Osteocalcin, osteopontin and RUNX2 genes expression and levels of miR-106b was performed using qPCR. Alkaline Phosphatase (ALP) activity was quantified and detected at the same period of observation. Morphologically, cMSCs transfected with an inhibitor of miR-106b appeared as osteocyte-like cells when compared to the same cells transfected with the mimic of miR-106b. cMSCs showed miR-106b transcription after 7 days of osteoinduction was at a low level compared to the positive control, whereas transfected cells with the miR-106b mimic showed miR-106b to be upregulated. After inhibition of miR-106b expression in osteoinduced cMSCs, ALP activity was increased. Osteocalcin, osteopontin and RUNX2 mRNA transcription were upregulated at 21 days after osteoinduction following miR-106b inhibition. This study demonstrated that miR-106b influences in vitro osteogenesis of cMSCs and could be a promising for veterinary medicine.

Keywords: Dogs, gene expression, stromal mesenchymal cells - dogs, cell differentiation, microRNAs.

1 Introduction

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multi-potent progenitor cells and can be cultured from adult and foetal tissues. In humans, as well as veterinary medicine, MSCs have been successfully harvested from a wide range of tissues [1,2]. As an alternative source of MSCs, foetal or neonatal MSCs appear to be more primitive and have greater multi-potentiality than their adult counterparts [3]. Their intermediate state between adult and embryonic stem cells also makes them an ideal candidate for reprogramming pluripotent status [4]. In humans, Wharton's jelly, an umbilical cord tissue, has been used as a source of MSCs, and studies in many different animal species have also shown their capacity to be classified as a promising source of stem cells [3,5].

Canine Wharton's jelly derived MSCs have been previously isolated and characterized; however, few studies have utilized these MSCs in *in vivo* treatments [6,7]. Previously, canine Wharton's jelly derived MSCs have been isolated and differentiated towards osteogenic lineages [8,9]. There are many protocols of culture and differentiation of MSCs into osteogenic lineages in the literature [10-12]. However, Platelet-Rich Plasma (PRP) and dexamethasone exposure were the inducers of osteogenesis most frequently applied to canine Wharton's jelly derived MSCs to date [6,8,9]. Additionally, dogs are considered to be a good model system for the investigation into human orthopaedic disease because these two species share similar bone pathologies.

MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous single-stranded noncoding RNAs that are present in many organisms and repress gene expression by binding to mRNA. Moreover, miRNAs seem to have important regulatory roles in osteocyte proliferation, differentiation and function [13]. There is recent evidence that miRNAs have a crucial role in regulating the complex process of osteoblastic bone formation and osteoclastogenesis [13]. miR-106b is a member of the miR-106b-25 cluster and has been implicated in the immune response and tumourigenesis [14,15]. A recent study has demonstrated that silencing miR-106b accelerates osteogenesis of human MSCs derived from human normal term

placentas [16]. Despite several studies that describe the role of miRNAs in many biological processes, there is a lack of information in veterinary science related to miRNAs and stem cells.

In this study, we investigated whether miR-106b is expressed in canine MSCs derived from Wharton's jelly before and after osteoinduction, during 0, 7, 14 and 21 days of in vitro observation. In addition, we also determined whether transfecting MSCs with a mimic and/or inhibitor of miR-106b interferes with mineralization and osteoblastic gene expression.

2 Materials and Methods

Cell Culture of Canine MSCs

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), Invitrogen (Invitrogen®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems™ (Applied Biosystems™, CA, USA). All tissue culture plastic was purchased from BD Falcon™ (BD Falcon, Bedford, USA) unless otherwise specified. Canine MSC cultures were obtained from canine Wharton's jelly, collected from umbilical cords, as described previously [9], and were stored at -86°C until used. The culture was established in Stemline® Mesenchymal stem cell expansion medium with 2 mM L-glutamine and incubated at 37°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The medium was refreshed every 24 h, and images were acquired to observe the morphology at five-day intervals. The cell lines were then expanded until they reached subconfluence of 80-90%, at which time they were harvested by detachment after a 5-min incubation period with 0.25% trypsin. Cells were then replated into culture flasks at a 1:5 split ratio. For passaging, 1 x 10⁶ cells were replated in 25 cm² flasks in the same conditions as in the culture, and the cells were analysed for their capacity for differentiation.

Cell Transfection

Prior to osteogenic differentiation, canine MSCs were transfected with miR-106b mimic and miR-106b inhibitor, and untransfected cells were considered to be the negative control. The cells were plated in 6-well plates, and when they reached 25-30% of confluency, the medium was removed and 3 washes with phosphate buffered solution were performed. Then, 3 ml of Opti-MEM® reduced serum medium was added, together with 100 pmol RNA oligomer (miR-106b mimic and inhibitor) mixed with 5 µl of Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). The plates were incubated for 8 h, and when cell confluency reached 45-55%, osteoinduction was performed. All analyses were performed at 0, 7, 14 and 21 days after osteogenic differentiation as described below.

Osteogenic Differentiation, ALP Activity and Staining

For the osteogenic differentiation, cells at passage 5 were plated at 1 x 10⁶ cells / ml in 6-well culture plates under the same culture conditions described previously [9]. Undifferentiated cells were analyzed as a negative control. After differentiation, the cells were stained with Von Kossa to confirm calcium deposition [7]. It is well established that ALP cleaves the phosphate group from p-nitrophenyl phosphate to form p-nitrophenol, from 10 to 21 days after osteoinduction of canine MSCs derived from Wharton's jelly [9]. ALP activity was measured using the Alkaline Phosphatase detection kit (AKP/ALP™, Sigma-Aldrich®). For ALP staining, all procedures followed steps described previously [9].

RNA Reverse Transcription and quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

At 0, 7, 14 and 21 days after osteogenic differentiation, cells were collected and total RNA was extracted using the TRizol™ total RNA isolation method [9]. cDNA synthesis was conducted using an Enhanced Avian™ RT First Strand

Synthesis Kit (SigmaAldrich®) and primers and probes for qRT-PCR specific to dog (*Canis familiaris*) osteopontin, osteocalcin, and Runx2 genes were commercially purchased (Applied Biosystems™). Assays to quantify mature miRNAs were carried out using TaqMan™ microRNA probes, with both primers and probes mapping within a single exon sequence (Applied Biosystems™). Quantification of gene expression was performed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using the dog GAPDH gene as a reference [9]. The results are expressed as relative gene expression, which indicates how many times (fold change) the gene expression is higher (upregulated) or lower (down-regulated) in all studied groups.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Graph PadInstat 6.00 for Windows (Graph Pad Software, LaJolla, CA, USA). Four replicates of each experiment were performed, and the results are reported as the mean $\pm$ s.d. One-way ANOVA was used for multiple comparisons. A p-value of < 0.05 was considered to be significant.

3 Results

Canine MSC Culture and Osteoblast Differentiation is Associated with miR-106b Expression

Canine MSCs isolated from Wharton's jelly were characterized for their osteogenic differentiation and exhibited changes in cell morphology 21 days after induction (Figure 1A-D).

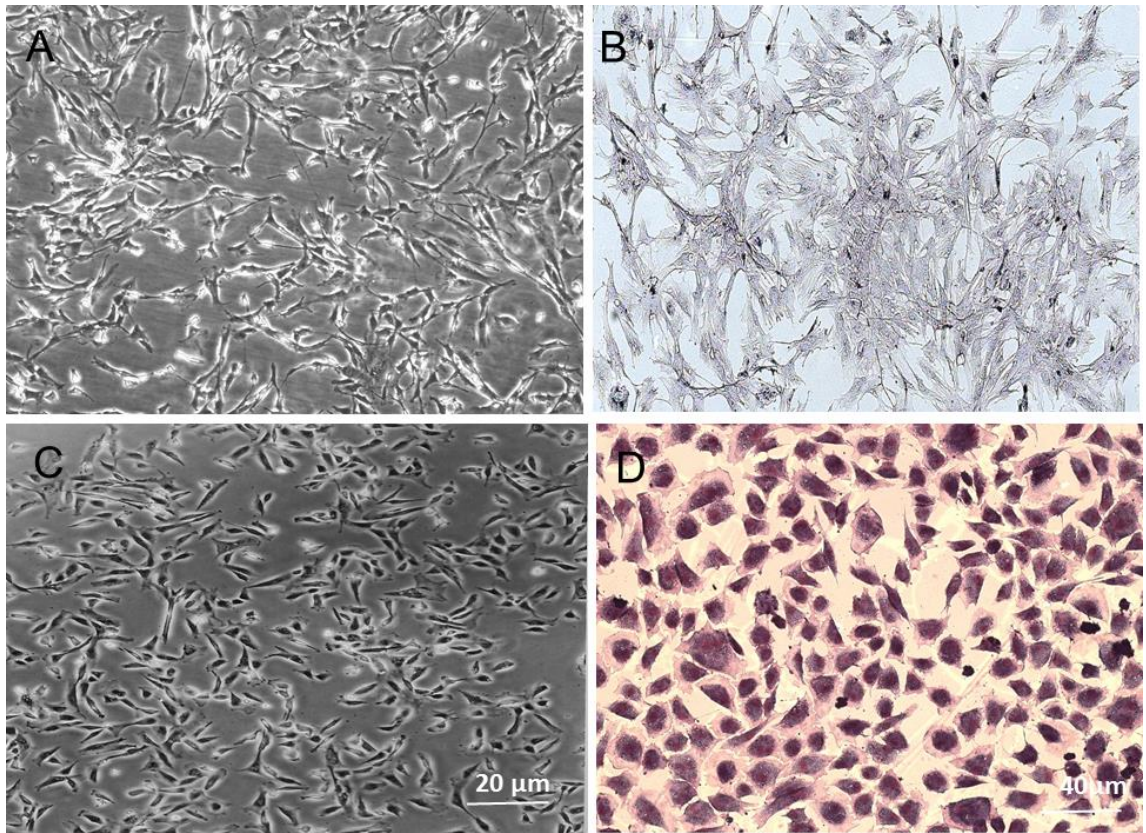


Figure 1 - Morphology of canine MSCs (cMSCs) isolated from Wharton's jelly closely resembled MSC-like cells (A and C). Micrographs were captured under phase contrast microscopy. After osteogenic differentiation, cMSCs transfected with mimic miR-106b (B) and by inhibitor miR-106b (D) following Von Kossa's staining. Scale bars 20 μm .

To evaluate the biological function of miR-106b in osteogenesis, a miR-106b mimic and inhibitor were transfected into canine MSCs. Cells transfected with the mimic changed their morphology from spindle-shaped to fusiform in a late stage of differentiation (Figure 1A and B). Moreover, when canine MSCs were transfected with the miR-106b inhibitor, their morphology changed to that of polygonal cells (Figure 1C and D). We then measured the level of expression of miR-106b in canine MSCs during osteogenesis without transfection and found that its expression significantly decreased during MSC differentiation (Figure 2A).

However, when miR-106b transcription was assessed in transfected MSC cells with mimic miR-106b, we observed higher levels of transcript than when the inhibitor was transfected (Figure 2B; $p < 0.05$).

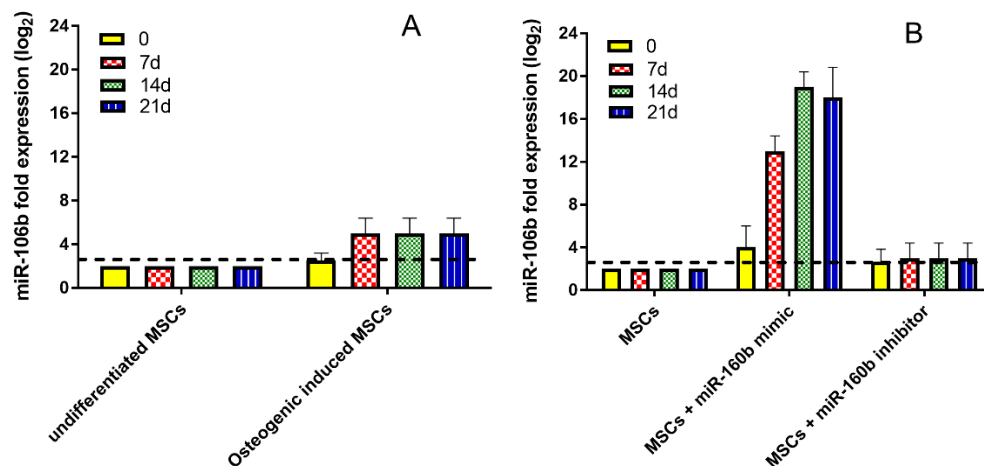


Figure 2 - Fold change presented as the mean $\pm$ SD ($n=3$ for all experiments). miR-106b expression in undifferentiated and osteoinduced cMSCs (A) at 0, 7, 14 and 21 days of observation. miR-106b expression in undifferentiated cells, cells transfected with a mimic of miR-106b, and cells with an inhibitor of miR-106b (B).

Quantification of Mineralization Alizarin Red S (ARS) staining was used to detect the calcium mineralization of three experimental conditions of canine MSCs: MSCs without miR-106b transfection, miR-106b mimic, and inhibitor transfection (Figure 3A and B). ALP activity was higher after 21 days following osteoinduction when compared with canine MSCs transfected with a miR-106b mimic (Figure 3A; $p < 0.05$). In contrast, when canine MSCs were transfected with a miR-106b inhibitor, ALP activity was higher after the same period of observation, compared to untransfected and miR-106b mimictransfected canine MSCs (Figure 3A and b; $p < 0.05$). After staining with ARS, calcium-rich deposits were visible as red in colour and appeared more intense in canine MSCs without transfections when compared to the mimic and inhibitor miR-106b transfected

cells, respectively (Figure 4A, B and C). However, the morphology was distinct among groups; miR-106b inhibition produced a monolayer of uniform polygonal cells (Figure 4C), in contrast to the fusiform shape, seen following either no transfection or miR-106b mimic transfection (Figure 4A and B).

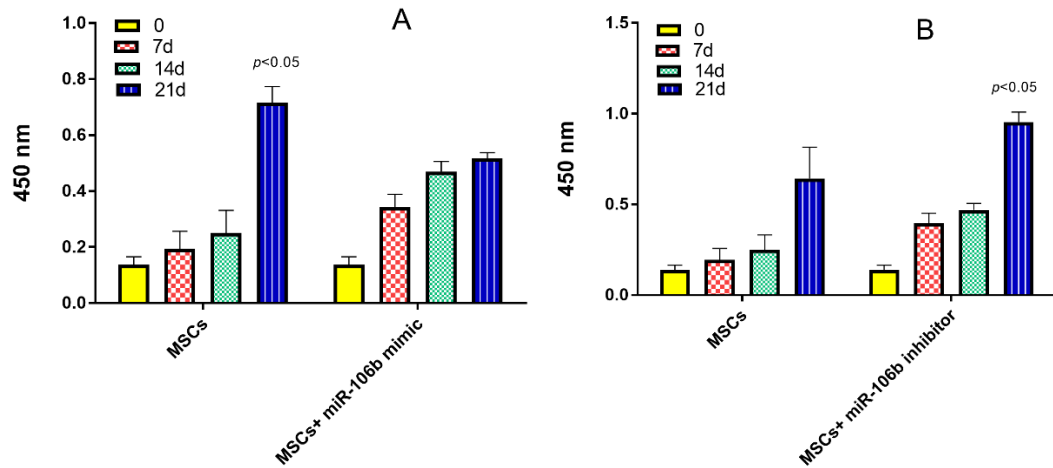


Figure 3 - Relative alkaline phosphatase (ALP) activity. Untransfected cMSCs and miR-106b mimic transfected cells showed a significant difference in activity after 21 days after osteoinduction ($p < 0.05$). The same results were obtained when cMSCs were transfected with a miR-106b inhibitor (B). Data were obtained from three consecutive experiments.

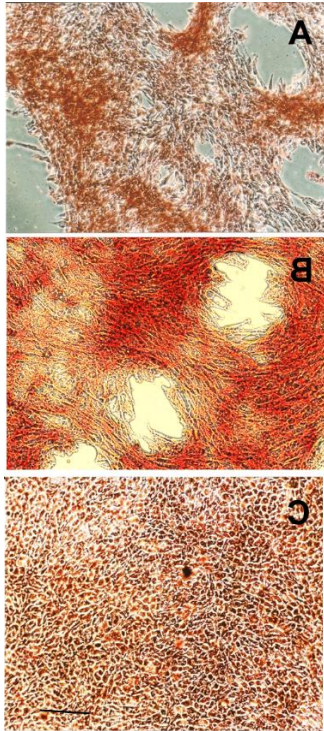


Figure 4 - Alizarin Red staining showing extracellular matrix deposition and mineralization of cMSCs subjected to osteodifferentiation without miR-106b transfection (A), cMSCs transfected with a mimic of miR-106b (B) and an inhibitor (C). Bar 40 μ m.

Osteoblastic Genes and miR-106b Transcription

After osteogenic induction, expression levels of osteocalcin, osteopontin and RUNX2, which are related to osteogenesis, were measured at 0, 7, 14 and 21 days of observation in cells transfected with a mimic or an inhibitor of miR-106b (Figure 5A-C). The expression of osteocalcin was significantly upregulated after 21 days of osteoinduction when miR-106b inhibitor was transfected (Figure 5A). This phenomenon was also observed for osteopontin and RUNX2 gene expression (Figure 5B and C). Interestingly, miR-106b was upregulated in transfected canine MSCs during osteogenic induction (Figure 2B), yet this may not influence the expression of osteoblastic genes, which were considered to be at a lower level (Figure 5A, B and C).

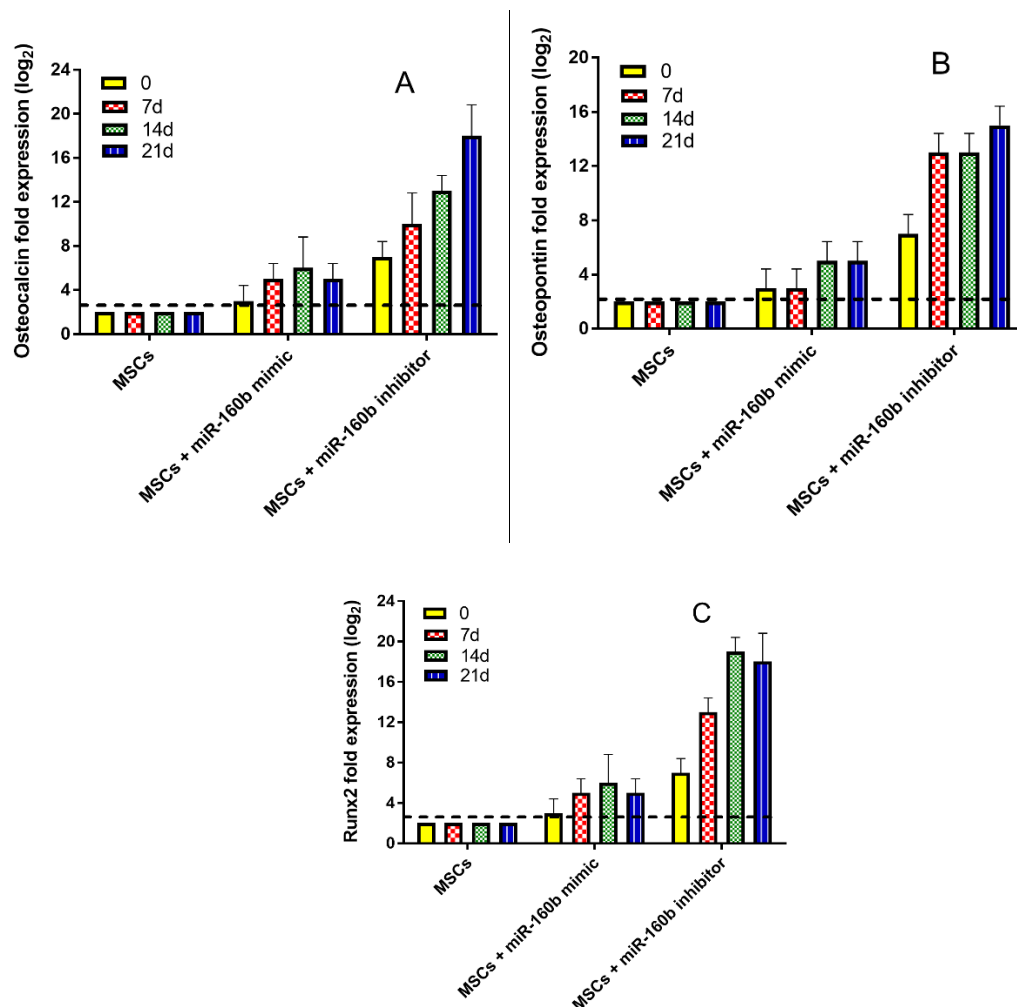


Figure 5 - Relative mRNA expression of osteoblast-related genes osteocalcin (A), osteopontin (B) and *RUNX2* (C) at 0, 7, 14 and 21 days, assayed by qRT-PCR. The gene expression was normalized using GAPDH expression for cMSCs (not transfected), transfected cMSCs with a mimic of miR-106b, and those transfected with an inhibitor. Data of fold change are presented as the mean $\pm$ SD ($p < 0.005$) in three consecutive experiments.

4 Discussion

Stem cell studies in veterinary medicine continue to produce rapid experimental and clinical results. In particular, canine-derived MSCs have been isolated from adipose tissues [17], umbilical cord [8], bone marrow [10,18-20] and Wharton's jelly [8,9,21]. Moreover, Wharton's jelly derived canine MSCs were first isolated and characterized five years ago [7]. In addition, many reports describe different procedures of maintenance and culture of Wharton's jelly derived canine MSCs and their advantages over other MSC sources [1-4,21].

This study used Wharton's jelly derived canine MSC cells, which have been well characterized previously [5,7,9]. However, the application of Platelet-Rich Plasma (PRP) as a supplement [9] was not included in this study due to controversial results found in the literature [20]. In fact, the osteogenic potential of canine MSCs obtained from Wharton's jelly in repairing bone defects has been previously evaluated [8,9] and was shown to be appropriate for in vitro bone engineering techniques. In our previous study, when canine MSCs were isolated and characterized from canine Wharton's jelly, expression levels of osteocalcin, osteopontin and RUNX2, considered to be directly associated with osteogenesis, were upregulated after 21 days of osteoinduction under different culture conditions [9]. However, our findings here are similar to the results found when same culture conditions were applied in the first characterization of canine MSCs derived from Wharton's jelly [7].

Here, it has been demonstrated that miR-106b is a negative regulator of osteogenesis of canine MSCs derived from Wharton's jelly. The in vitro evidence indicated that miR-106b expression could inhibit the mRNA transcription of Runx2, osteocalcin, and osteopontin, followed by a decrease in ALP activity. However, inhibition of miR-106b expression reversed the phenotype. Recently, emerging evidence has shown that miRNAs are closely involved in regulating key steps of osteogenesis in MSCs [13]. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNA molecules of only 22 nucleotides in length that regulate protein expression

by binding the 3' untranslated region of a target miRNA [13]. Despite many reports of miRNA inhibition and/or activation in human MSCs, there is a lack of information on this topic in veterinary science.

Osteogenesis is a process regulated by several signals. One of these is Runx2 signalling, the expression of which interferes with osteogenesis via a complex network of miRNAs [13]. Recently, repair of canine medial orbital bone defects with miR-31 -modified bone marrow mesenchymal stem cells was described [22]. A previous study showed that miR-31 negatively regulates osteoinduction of bone marrow-derived canine MSCs [22]. Similar work has demonstrated that suppression of miR-106b in human MSCs isolated from bone marrow had a positive effect on differentiation into osteo-like cells [13]. Despite some studies in human MSCs, little if any information is available about the participation of miRNAs in animal MSCs. For example, miR-125b was the first miRNA reported to influence osteogenesis by regulating MSC proliferation [22]. Since then, several miRNAs have been shown to induce or inhibit MSC differentiation [13]. Although evidence suggests that miRNAs take part in MSCs proliferation and differentiation, more studies are required to elucidate the exact pathway of a complex network of several miRNAs that act in concert to regulate expression of a single gene.

5 conclusions

To the best of our knowledge, this study demonstrated that miR-106b influences in vitro osteogenesis of cMSCs isolated from Wharton's jelly. Moreover, after inhibition of miR-106b, genes related to osteogenesis were positively regulated. These results may be an important tool and indicate that several miRNAs targets should be investigated in veterinary medicine.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2012/16715-6) for their support. TC Cardoso is a recipient of CNPq (Brazilian Council for Research) fellowships and funding.

6 References

BRETT J.O.; RENAULT V.M.; RAFALSKI V.A. et al. The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. **Aging**. V. 3, p.108-124, 2011

DENG Y.; BI X.; ZHOU H. et al. Repair of critical size bone defects with anti-miR-31-expressing bone marrow stromal stem cells poly (glycerol sebacate) scaffolds. **Eur Cell Mater** V. 27, p. 13-24, 2014.

DENG Y.; ZHOU H.; GU P. et al. Repair of canine medial orbital bone defects with miR-31-modified bone marrow mesenchymal stem cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. V. 55, p. 6061-6023, 2014.

FORTIER L.A.; TRAVIS A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Res Ther**. V. 2, p. 9, 2009.

HODGKISS-GEERE H.M.; ARGYLE D.J.; CORCORAN B.M.; et al. Characterization and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells. **Vet J**. V. 194, p. 361-368, 2012.

HOFFMAN A.M.; DOW S.W. Concise Review: Stem cell trials using companion animal disease models. **Stem Cells** V. 34 p.1709-1729, 2016.

HODGKISS-GEERE H.M.; ARGYLE D.J.; CORCORAN B.M. et al. Characterization and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells. **Vet J.** V.194, p. 361-368, 2012.

HOFFMAN A.M.; DOW S.W. Concise Review: Stem cell trials using companion animal disease models. **Stem Cells.** V. 34, p. 1709-1729, 2016.

HUANG C.; GENG J.; JIANG S. MicroRNAs in regulation of os-7. teogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res.** V. 368, p. 229-238, 2016.

KANG B.J.; RYU H.H.; PARK S.S. et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **J Vet Sci.** V.13, p.299-310, 2012.

KIM Y.; LEE SH.; KANG B.J. et al. Comparison of osteogenesis between adipose-derived mesenchymal cells and their sheets on poly- ϵ -caprolactone/ β -tricalcium phosphate composition scaffolds in canine bone defects. **Stem Cell Int.** V. 8, p. 41-47, 2015.

LEE K.S.; NAH J.J.; LEE B.C. et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Res Vet Sci.** V. 94, p.144-151, 2013.

LIU K.; JING Y.; ZHANG W. et al. Silencing miR-106b accelerates osteogenesis of mesenchymal stem cells and rescues against glucocorticoid-induced osteoporosis by targeting BMP2. **Bone**. V. 97, p. 130-138, 2017.

MARX C.; SILVEIRA MD.; NARDI NB. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem Cells Develop**. V. 24, p. 803-813, 2015.

MIZUNO Y.; YAGI K.; TOKUZAWA Y. et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. **BiochemBiophys Res Comm**. V.368, p.267-272, 2008.

RUSSEL K.A.; GIBSON T.W.G.; CHONG A. et al. Canine platelet lysate is inferior to fetal bovine serum for the isolation and propagation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS**. V. 9, p. 621, 2015.

RUSSEL K.A.; GIBSON T.W.G.; CHONG A.; et al. Canine platelet lysate is inferior to fetal bovine serum for the isolation and propagation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS One**. V. 10, p. 621, 2015.

SEO M.S.; PARK S.B.; KANG K.S. Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. **Cell Transplant**. V. 21, p.1493-1502, 2012.

SOUZA T.F.; S.S. SAKAMOTO.; G.T. FERREIRA. et al. Osteogenic potential of mesenchymal cells derived from canine umbilical cord matrix co-cultured with platelet-rich plasma and demineralized bone matrix. **J Vet Sci**. V.16, p.381-384, 2015.

TAGHIZADEH R.R.; CETRULO K.J.; CETRULO C.L. Wharton's jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta* 32:311-315. Troyer DL, ML Weiss Wharton's Jelly-derived cells are primitive 19. stromal cell population. **Stem Cells** V. 26, p. 591-599, 2011.

VAN PHAM P.; TRUONG N.C.; LE P.T. et al. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. **Cell Tissue Bank**. V. 17, p. 289-302, 2015.

YU D.; SHIN H.S.; LEE Y.S. et al. miR-106b modulates cancer stem cell characteristics through TGF- β /Smad signaling in CD44-positive gastric cancer cells. **Lab Invest**. V. 94, p.1370-1381, 2014.

ZHOU N.; LI Q.; LIN N. et al. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. **Cell Tissue Res**. V. 366, p.101-111, 2016.