



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL



GEORGIA KORS QUILES

**Efeito da sobre-expressão de BMP-9 na diferenciação osteoblástica de células-tronco
mesenquimais**

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO MATEUS BELOTI

RIBEIRÃO PRETO

2024

GEORGIA KORS QUILES

Efeito da sobre-expressão de BMP-9 na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Cirurgiã-Dentista.

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO MATEUS BELOTI

RIBEIRÃO PRETO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** por ter me acolhido ao longo desses anos, **ao corpo docente** por todos os ensinamentos, aprendizados e experiências que foram fundamentais para minha formação e **a todos os funcionários** sem os quais não seria possível o funcionamento dessa instituição.

Ao meu orientador, Professor Doutor Marcio Mateus Beloti, e à minha coorientadora, Helena Bacha Lopes, pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa e por todas as contribuições valiosas para meu crescimento pessoal e profissional. **A todo grupo de pesquisa Bone Research Lab**, professores, técnicos e alunos, por toda parceria, apoio e experiências vividas nesses anos.

Ao órgão de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo amparo social e financeiro que permitiram a efetivação desse projeto.

À **minha família**, Celso Antônio Quiles, Tatiana Maria Meirelles Kors Quiles, Henrique Kors Quiles, Renata Kors Quiles e Gessica Bertoncelli Quiles, meus amados pais, irmãos e cunhada, pelo amor, apoio, dedicação e confiança que sempre tiveram por mim.

Ao meu companheiro de vida, João Felipe Denys Pereira, por estar sempre do meu lado, ser meu maior incentivador e meu porto seguro.

Aos meus amigos com os quais tive a honra de compartilhar a maioria dos meus dias nesses últimos cinco anos, e com aqueles que estavam longe fisicamente, mas nunca deixaram de estar ao meu lado.

RESUMO

QUILES, Georgia Kors. **Efeito da sobre-expressão de BMP-9 na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais**. 2024. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O uso da terapia celular tem grande potencial para regeneração óssea, porém, sem ainda induzir a completa regeneração do tecido. A proteína morfogenética óssea 9 (BMP-9) tem grande potencial osseointegrador e, portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da sobre-expressão da BMP-9, na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (CTMs). Para tal, CTMs derivadas da medula óssea de camundongos foram modificadas geneticamente para sobre-expressar BMP-9 (CTMs-BMP-9) através da técnica de agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente espaçadas (CRISPR-Cas9) e cultivadas em meios de crescimento por até 21 dias. CTMs não modificadas (CTMs-VPR) foram utilizadas como controle. Foram avaliadas a expressão gênica de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Oc*, *Opn* e *Bsp* aos 3, 7, 10 e 14 dias (n=4); a expressão gênica dos componentes da via de BMP/TGF- β por PCR Array aos 7 dias (n=3); a atividade de ALP in situ aos 3, 7, 10 e 14 dias (n=5); e a formação da matriz mineralizada aos 14, 17 e 21 dias (n=5). Os dados foram analisados por teste T de Student ou ANOVA ($p \leq 0,05$). Os resultados da expressão gênica apresentaram uma maior expressão de *Runx2* nos dias 3 e 7 ($p < 0,05$ para ambos), de *Alp* nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p < 0,05$ para todos), de *Bsp* no dia 3 ($p < 0,05$), de *Opn* no dia 7 ($p < 0,05$), e de *Osx* nos dias 3 e 7 ($p < 0,05$ para ambos) nas CTMs-BMP-9 comparadas às CTMs-VPR. Os demais períodos apresentaram menor expressão ou ausência de diferença estatística significativa. O painel de genes envolvidos na via de sinalização intracelular mostrou 50 genes com regulação aumentada ($p \leq 0,05$), e 10 genes com regulação diminuída ($p \leq 0,05$) nas CTMs-BMP-9 quando comparadas às CTMs-VPR. A atividade de ALP in situ foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 nas CTMs-BMP-9 comparadas às CTMs. A matriz extracelular mineralizada foi maior nas CTMs-BMP-9 apenas no período de 21 dias ($p < 0,05$). A sobre-expressão de BMP-9 através da técnica CRISPR-Cas9 mostrou-se favorável à diferenciação osteoblástica de CTMs, podendo ser uma alternativa promissora para ampliar a eficácia da terapia celular.

Palavras-chave: BMP-9. Célula-tronco mesenquimal. CRISPR. Tecido ósseo. Osteoblasto.

ABSTRACT

QUILES, Georgia Kors. **Effect of overexpression of BMP-9 on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells**. 2024. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Cell therapy has shown great potential for bone regeneration, however, without inducing the whole tissue regeneration. Bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) has great osseoinductive potential and, therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of overexpression of BMP-9 on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs derived from mice bone marrow were genetically modified to overexpress BMP-9 (MSCs-BMP-9) by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats technology (CRISPR-Cas9) and cultured in growth medium up to 21 days. MSCs were used as control (MSCs-VPR). Gene expression of *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Oc*, *Opn* and *Bsp* was evaluated at 3, 7, 10 and 14 days (n=4); gene expression components of BMP/TGF- β pathway by PCR Array at 7 days (n=3); ALP activity in situ at 3, 7, 10 and 14 days (n=5); and mineralized matrix formation at 14, 17 and 21 days (n=5). The data were analyzed by Student's T test or ANOVA ($p \leq 0.05$). Gene expression was higher for *Runx2* on days 3 and 7 ($p < 0.05$ for both), for *Alp* on days 3, 7, 10 and 14 ($p < 0.05$ for all), for *Bsp* on day 3 ($p < 0.05$), for *Opn* on day 7 ($p < 0.05$), and for *Osx* on days 3 and 7 ($p < 0.05$ for both) in MSCs-BMP-9 compared to MSCs-VPR. The gene expression of other periods was lower or exhibited lack of significant statistical differences. The panel of genes involved in the intracellular signaling pathway showed upregulation of 50 genes ($p \leq 0.05$), and downregulation of 10 genes ($p \leq 0.05$) in MSCs-BMP-9 when compared to MSCs-VPR. ALP activity in situ was higher on days 3, 7, 10 and 14 in MSCs-BMP-9 compared to MSCs-VPR. The mineralized extracellular matrix was higher in MSCs-BMP-9 on day 21 ($p < 0.05$) when compared to MSCs-VPR. Overexpression of BMP-9 through the CRISPR-Cas9 technique proved to be favorable to the osteoblastic differentiation of MSCs, which could be a promising alternative to increase the effectiveness of cell therapy.

Keywords: BMP-9. Mesenchymal stem cell. CRISPR. Bone tissue. Osteoblast.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	10
<i>CULTURA E EXPANSÃO DAS CTMS CONTROLES E DAS CTMS SOBRE EXPRESSANDO BMP9</i>	<i>10</i>
<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL</i>	<i>10</i>
<i>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DAS BMPs POR PCR ARRAY</i>	<i>11</i>
<i>ATIVIDADE DA ALP</i>	<i>12</i>
<i>DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR MINERALIZADA</i>	<i>12</i>
<i>ANÁLISE DOS RESULTADOS</i>	<i>13</i>
RESULTADOS	14
<i>EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL</i>	<i>14</i>
<i>EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DAS BMPs POR PCR ARRAY</i>	<i>16</i>
<i>ATIVIDADE DA ALP IN SITU</i>	<i>19</i>
<i>AValiação DA FORMAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR MINERALIZADA</i>	<i>20</i>
DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui uma capacidade de autorreparo que é dependente da extensão e da gravidade da lesão. A cicatrização óssea é um processo complexo de fases sobrepostas, incluindo inflamação, reparo e remodelação que envolve as muitas vias de sinalização intracelular que são responsáveis pela regeneração do novo osso com a ajuda dos tecidos adjacentes (Brydone et al., 2010; Oryan et al., 2014b; Moshiri et al., 2015b). Quando a extensão da lesão excede a capacidade de regeneração do tecido, outras modalidades de tratamento são requeridas, entre elas a utilização da terapia celular (Horwitz et al., 2001; Hernigou et al., 2005a e 2005b; Kim et al., 2009).

Em estudos experimentais pré-clínicos, foi demonstrado que a utilização de células derivadas da medula óssea mostrou uma considerável formação óssea, porém sem a completa regeneração do defeito ósseo (Aykan et al., 2013; Liao et al., 2011; Yan et al., 2009; Yamada et al., 2004). Pensando nisso, diversos estudos têm buscado refinar a técnica da terapia celular como um tratamento efetivo para regeneração óssea. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com terapia gênica para sobre-expressar proteínas com alto potencial de formação e reparo ósseo pela técnica de manipulação gênica CRISPR-Cas9, para que posteriormente essas células possam ser utilizadas na terapia celular.

A tecnologia CRISPR em procariotos, originalmente descoberto na bactéria *Streptococcus pyogenes*, tem revolucionado o campo de biologia molecular e engenharia genética. O sistema utiliza uma nuclease associada ao CRISPR (Cas9) que forma um complexo com pequenos RNAs guias (gRNAs) para clivagem do DNA (Barrangou et al., 2007; Redman et al., 2016; Xiao-Jie et al., 2015). Além disso, a Cas9 pode ser inativada (dCas9) e associada a proteínas ativadoras da transcrição gênica (VPR), o que traz vantagens sobre outros sistemas de ativação gênica devido a sua capacidade de obter modulação precisa e eficiente de DNA com alto grau de ativação da transcrição proteica de genes alvos (Zhou et al., 2018).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são citocinas pertencentes à família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e têm entre seus membros potentes agentes ósseo-indutores (Bonilla-Claudio et al., 2012; Singhatanadgit et al., 2011; Senta et al., 2009). As BMPs presentes no tecido ósseo desmineralizado (1-2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) promovem formação óssea ectópica in vivo como demonstrado por Urist (1965). Sabe-se que as BMPs estão presentes em ossos originários dos dois tipos de ossificação, endocondral e intramembranosa, e que estas agem em células ósseas por meio de duas vias de sinalização, Smad-dependente (via

canônica) e dependente de proteína quinase ativada por mitogênicos (MAPK) (Herpin et al., 2007; Zhang et al., 2005). Os efeitos das BMPs em células osteoblásticas são amplamente discutidos na literatura. No entanto, a BMP-9, que tem ação proliferativa e anti-apoptótica é considerada uma das mais osteogênicas, mas ainda pouco explorada (Herrera et al., 2013; Wang et al., 2013). Em culturas de células-tronco, a BMP-9 induz a diferenciação osteoblástica ativando a via de sinalização Smad-dependente (Lamplot et al., 2013; Beederman et al., 2013). Em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, a BMP-9 mostrou maior potencial osteogênico que a BMP-2 (Lauzon et al., 2014; Bergeron et al., 2009).

Considerando o acima exposto, células sobre expressando a proteína BMP-9 foram criadas utilizando a técnica CRISPR/Cas9 para serem, posteriormente, utilizadas na terapia celular. No entanto, uma caracterização detalhada da sua capacidade de diferenciação osteoblástica, bem como o efeito da sobre expressão gênica sobre a via de sinalização das BMPs se faz necessária previamente à sua utilização *in vivo*. Desta forma, esse projeto tem como objetivo avaliar o efeito da sobre-expressão de BMP-9 na diferenciação osteoblástica e na via de sinalização das BMPs por PCR Array em CTMs geneticamente modificadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura e expansão das CTMs controles e das CTMs sobre expressando BMP9

As CTMs já imortalizadas e transduzidas com a proteína dCas9 (Cas9 inativada) e a proteína ativadora da transcrição gênica VPR (CTM-VPR) foram usadas como controle e CTMs-VPR com o RNA guia para o gene BMP-9 (CTM-VPR-BMP9), foram produzidas através da técnica CRISPR-Cas9 no Departamento de Bioquímica da Universidade de Vermont, EUA, sob supervisão da Prof. Dra. Jane Lian. Ambas as CTMs e CTMs-BMP9 foram cultivadas em meio de cultura α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 0,2% Strep/Penicilina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies) (meio de crescimento) em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) por 10 dias para permitir a expansão destas. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera.

Após a expansão das células, elas foram plaqueadas para os experimentos descritos a seguir em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) em meio na densidade de 2×10^4 células/ poço e mantidas em meio de crescimento por até 21 dias.

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão gênica da *Bmp9* e dos marcadores ósseos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Oc*, *Opn* e *Bsp* foi avaliada por PCR em tempo real ao final de 3, 7, 10 e 14 dias de culturas. Foi realizada a extração do RNA total através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante e foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 μ g de RNA total. Esse procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems (Invitrogen-Life Technologies).

As reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão dos genes de interesse foram realizadas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 μ L contendo 5 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 μ L das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/ μ L de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C

por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão).

Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) e os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina.

Análise da expressão gênica de componentes envolvidos na via de sinalização das BMPs por PCR array

Para a realização do PCR array foi utilizado o sistema TaqMan Array Plates. A técnica da PCR array permitiu traçar um perfil de expressão de genes envolvidos na via de sinalização das BMPs em CTMs. Esta técnica permite a análise simultânea de 96 genes, sendo 90 genes alvo, 5 genes constitutivos e 1 controle positivo. Ao final de 7 dias de cultura, foi realizada a extração do RNA total através do kit V Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1 μ L de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA).

A partir de 1 μ g de RNA total foi confeccionada a fita de cDNA utilizando o kit Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo o volume final desta reação de 20 μ L. Em seguida, foram adicionados 520 μ L de água DNase-free no tubo contendo o cDNA sintetizado previamente e 540 μ L do TaqMan Fast Advanced Master Mix. Foram adicionados 10 μ L dessa mistura em cada poço da placa de 96 poços já contendo os pares de primers e a sonda liofilizados. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) sendo que a reação de amplificação compreenderá 2 minutos a 50°C, 20 segundos a 95°C e quarenta ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C.

Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) e os dados foram normalizados pelos genes constitutivos, *Actb*, *B2m*, *Hprt1*, *Ldha*, *Rplp1*, presentes na placa.

Atividade da ALP

Aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura, as células CTM-VPR e CTM-VPR-BMP9 foram lisadas para avaliação da atividade da ALP pela da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Brasil). Para obtenção dos lisados de células, o meio de cultura será removido e os poços serão lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco-Life Technologies, EUA) aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich) e ao final de 30 minutos, a solução contida em cada poço será homogeneizada e 50 µL dessa solução serão transferidos para os tubos de ensaio. Serão utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos serão adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão serão acrescentados 50 µL da solução padrão. Todos os tubos serão incubados a 37°C por 10 minutos. Após esse período, serão adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 µL da solução de cada tubo serão transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated, EUA) e a densidade óptica será lida em comprimento de onda de 590 nm no espectrofotômetro µQuant (BioTek, EUA). A atividade de ALP será calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total, obtida a partir dos mesmos lisados celulares de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), e expressa como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

Detecção da formação de matriz extracelular mineralizada

Aos 14, 17 e 21 dias de cultura, as células CTM-VPR e CTM-VPR-BMP9 serão lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 minutos e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, serão coradas com vermelho de Alizarina S (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos, lavadas com PBS e água bidestilada, observadas por epifluorescência em microscópio Leica DMLB (Leica, Alemanha) e a quantificação será realizada por extração de cálcio. Em cada poço serão acrescentados 150 µL de ácido acético a 10% e as placas serão mantidas sob agitação por 30 minutos. A solução obtida será transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, 100 µL de óleo mineral serão adicionados às amostras que serão mantidas a 85°C por 10 minutos e transferidas para o gelo por 5 minutos. Os tubos serão centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos e ao final serão adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10%. Um volume de 150 µL

do sobrenadante será utilizado para a leitura em espectrofotômetro μ Quant (Biotek) em um comprimento de onda de 405 nm. Os dados serão expressos por absorbância.

Análise dos resultados

Os dados numéricos serão submetidos ao teste de aderência à curva normal para determinar o teste estatístico adequado. O nível de significância será de 5%.

RESULTADOS

Expressão gênica por PCR em tempo real

A extração de RNA das CTMs previamente cultivadas foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, EUA). Foi feita a avaliação da expressão dos genes fator de transcrição relacionado ao Runt-2 (*Runx2*), osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), osteocalcina (*Oc*), osteopontina (*Opn*) e sialoproteína óssea (*Bsp*) e proteína morfogenética 9 (*Bmp-9*) nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias como descrito no projeto inicial.

A expressão gênica de *Runx2* foi maior nos dias 3 e 7 ($p < 0,05$ para ambos) e menor nos dias 10 e 14 ($p < 0,05$ para ambos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1A). A expressão de *Alp* foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p < 0,05$ para todos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1B). A expressão gênica de *Oc* foi menor nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p < 0,05$ para todos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1C). A expressão gênica de *Bsp* foi maior no dia 3 ($p < 0,05$), menor no dia 14 ($p < 0,05$) e sem diferença estatisticamente significativa nos dias 7 e 10 ($p > 0,05$ para ambos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1D). A expressão gênica de *Opn* foi menor nos dias 3 e 10 ($p < 0,05$ para ambos), maior no dia 7 ($p < 0,05$) e sem diferença estatisticamente significativa no dia 14 em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1E). A expressão gênica de *Osx* foi maior nos dias 3 e 7 ($p < 0,05$ para ambos) e sem diferença estatisticamente significativa nos dias 10 e 14 ($p > 0,05$ para ambos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1F). A expressão gênica de *BMP-9* foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p < 0,05$ para todos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 1G).

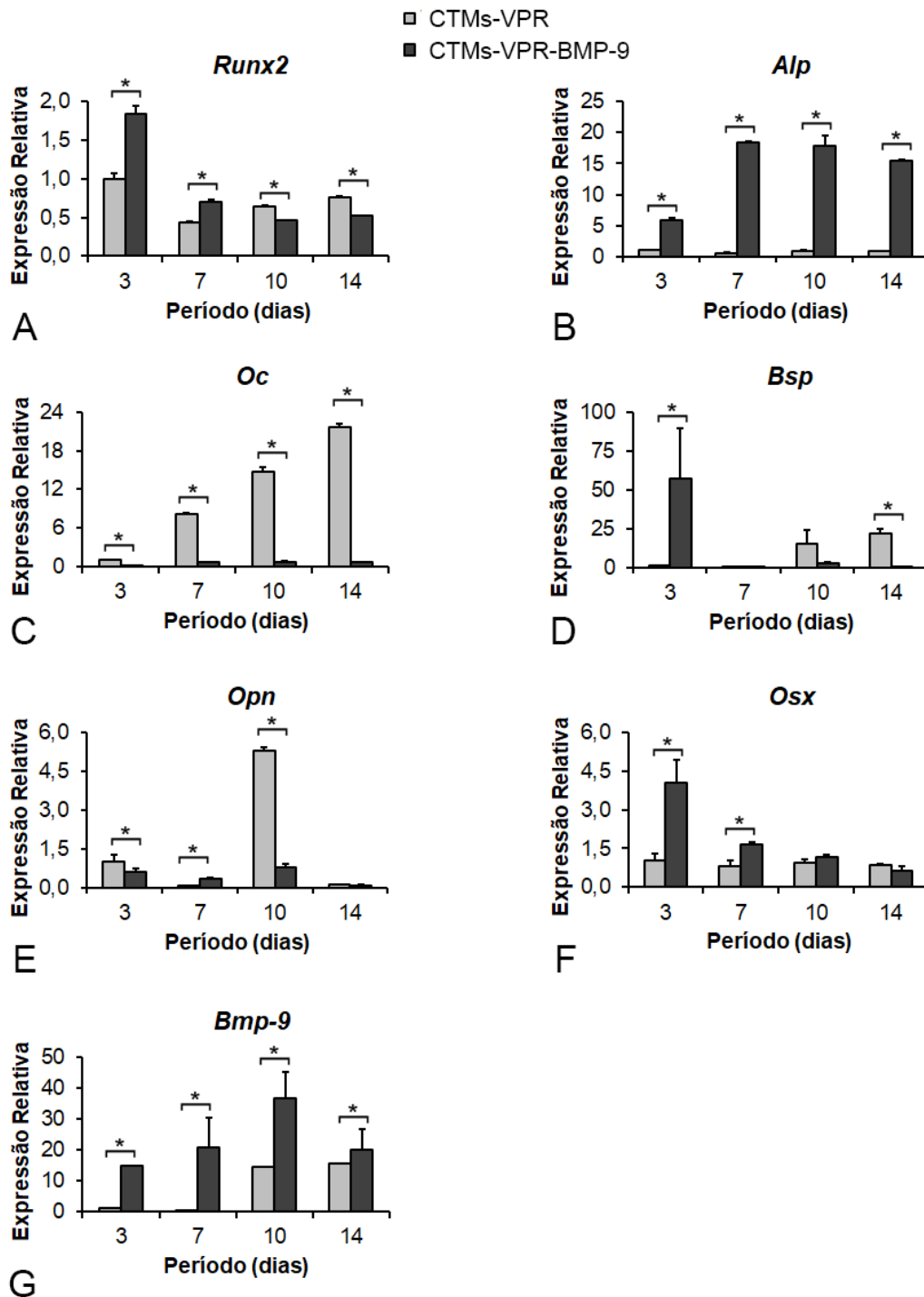


Figura 1. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Alp* (B), *Oc* (C), *Bsp* (D), *Opn* (E), *Osx* (F) e *Bmp-9* (G) em CTMs-VPR e CTMs-VPR-BMP-9 crescidas sobre poliestireno nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significante (Anova Two-Way, pós teste de Tukey, $p < 0,05$).

Expressão gênica de componentes envolvidos na via de sinalização das BMPs por PCR array

As CTMs-BMP-9 apresentaram mudanças no painel de genes envolvidos na via de sinalização de BMP/ TGF- β , apresentando 50 genes com regulação aumentada ($p \leq 0,05$), e 10 genes com regulação diminuída ($p \leq 0,05$), quando comparadas às CTMs-VPR. Dentre os genes com expressão aumentada destacam-se o *Tgf- β -1, -2, e -3, Bmp-1, -5, -6, -7 e -9*, seus receptores e moléculas de sinalização intracelular (*Smad-2, -3 e -4*), além dos fatores de transcrição sabidamente envolvidos na diferenciação osteoblástica, *Runx2 e Sox4*. O gene *Bambi*, que atua como inibidor da ativação da via de sinalização das BMPs, se apresentou com regulação diminuída ($p=0,019$) nas CTMs-BMP-9, quando comparadas às CTMs-VPR. A análise completa do ensaio de PCR Array pode ser conferida na Tabela 1.

Tabela 1. Expressão gênica de 84 genes a partir de placas PCR array customizadas em CTMs-VPR e CTMs-VPR-BMP-9 crescidas sobre poliestireno nos períodos de 7 dias. Análise estatística por Anova Two-Way, pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

Símbolo	Descrição	CTMs-BMP-9	Valor de p
Acvr1	Activin A receptor, type 1	2.01	0.00071
Acvr2a	Activin receptor IIA	1.27	0.002242
Amh	Anti-Mullerian hormone	3.02	0.000215
Atf4	Activating transcription fator 4	2.53	0.000001
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	3.00	0.000001
Bmp5	Bone morphogenetic protein 1	3.94	0.027201
Bmp6	Bone morphogenetic protein 1	4.56	0.000982
Bmp7	Bone morphogenetic protein 1	7.43	0.000995
Bmper	BMP-binding endothelial regulator	9.51	0.0000001
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	1.72	0.000089
Bmpr2	Bone morphogenic protein receptor, type II	1.25	0.000001

Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	16.04	0.000001
Cdkn2b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	1.52	0.000090
Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	2.49	0.0000001
Eng	Endoglin	3.35	0.000797
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	5.35	0.000301
Fst	Follistatin	30.14	0.000003
Gadd45b	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1.66	0.000525
Gdf2	Growth differentiation factor 2	2.97	0.004203
Gdf7	Growth differentiation factor 7	2.20	0.001743
Id1	Inhibitor of DNA binding 1	1.54	0.000001
Ifrd1	Interferon-related developmental regulator 1	1.44	0.000676
Igf1	Insulin-like growth factor 1	18.3	0.000069
Igfbp3	Insulin-like growth factor binding protein 3	24.57	0.000005
Inha	Inhibin alpha	3.21	0.000304
Inhba	Inhibin beta-A	2.78	0.000001
Junb	Jun-B oncogene	6.67	0.000001
Lefty1	Left right determination factor 1	3.23	0.008773
Ltbp1	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	2.18	0.000001
Ltbp2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	4.40	0.000001
Mecom	MDS1 and EVI1 complex locus	8.66	0.000001
Myc	Myelocytomatosis oncogene	1.92	0.000003
Plau	Plasminogen activator	6.04	0.000001

Runx1	Runt related transcription factor 1	1.56	0.000011
Smad1	MAD homolog 1	1.36	0.000073
Smad2	MAD homolog 2	3.44	0.000001
Smad3	MAD homolog 3	4.08	0.000008
Smad5	MAD homolog 5	2.59	0.000016
Smad7	MAD homolog 7	3.90	0.000001
Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	1.55	0.000058
Sox4	SRY-box containing gene 4	3.19	0.000055
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	7.43	0.000001
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	1.55	0.000020
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	2.86	0.000012
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	2.03	0.000038
Tgfbr2	Transforming growth factor, beta receptor II	5.69	0.000007
Tgfbr3	Transforming growth factor, beta receptor III	4.02	0.000016
Tgfbrap1	Transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	2.87	0.000014
Thbs1	Thrombospondin 1	9.06	0.000001
Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	34.99	0.000017
Bambi	BMP and activin membrane-bound inhibitor	-1.65	0.019774
Bglap2	Bone gamma-carboxyglutamate protein 2	-2.67	0.001996
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-1.34	0.000158

Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	-1.72	0.000002
Emp1	Epithelial membrane protein 1	-1.85	0.000001
Gsc	Goosecoid homeobox	-4.57	0.000003
Herpud1	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	-1.25	0.002147
Jun	Jun oncogene	-2.88	0.000024
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor	-1.93	0.000001
Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1	-1.42	0.001911

Atividade da ALP *in situ*

A atividade de ALP foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p \leq 0,05$) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR. Vale notar que a maior atividade de ALP nas células CTM-VPR foi detectada no dia 14, enquanto nas células CTM-VPR-BMP-9 foi no dia 10 (Figura 2).



Figura 2. Atividade de ALP em CTMs-VPR e CTMs-VPR-BMP-9 crescidas sobre poliestireno nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias.

Avaliação da formação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada foi maior no dia 21 ($p < 0,05$) e sem diferença estatisticamente significativa nos dias 14 e 17 ($p > 0,05$ para todos) em culturas de CTMs-VPR-BMP-9 comparadas com CTMs-VPR (Figura 3).

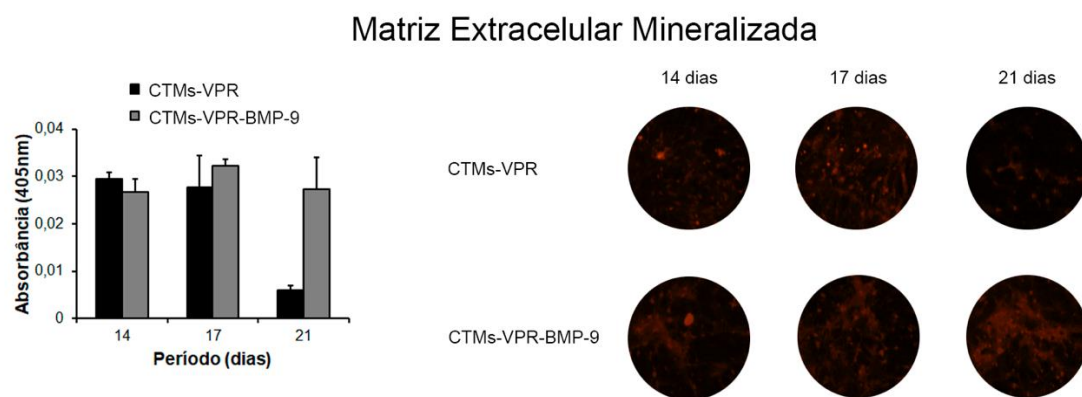


Figura 3. Formação de matriz extracelular mineralizada em CTMs-VPR e CTMs-VPR-BMP-9 crescidas sobre poliestireno nos períodos de 14, 17 e 21 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significante (Anova Two-Way, pós teste de Tukey, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A BMP-9 foi descrita como a de maior potencial osteogênico dentre das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Herrera et al., 2013; Wang et al., 2013). Além disso, ela demonstrou um potencial angiogênico por provocar, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais e estruturas vasculares e, *in vivo*, a angiogênese (Porcú et al., 2018; Mostafa et al., 2019; Chengcheng et al., 2022). Baseado nesses achados, CTMs sobre-expressando a BMP-9 foram criadas pela técnica de CRISPR para serem utilizadas na terapia celular para regeneração de defeitos ósseos. No entanto, a caracterização genotípica e fenotípica *in vitro* dessas células é fundamental para anteceder os estudos *in vivo*.

A sobre-expressão de BMP-9 foi confirmada pela expressão gênica aumentada de *Bmp-9* nas CTM-VPR-BMP-9 crescida em meio de crescimento. O potencial osteogênico desse gene mostrou seu efeito ao provocar um aumento de outros marcadores de diferenciação osteoblástica, como o *Runx2*, *Osx* e *Alp* (Lian et al., 2006; Nakashima et al., 2002; Millán, 2013), atividade de ALP e mineralização de matriz extracelular. Houve uma sobre expressão dos genes *Runx2* e *Osx* nos períodos iniciais da diferenciação osteoblástica, enquanto os genes *Bmp-9* e *Alp* estavam sobre expressos em períodos mais tardios.

A sobre-expressão de BMP-9 foi capaz de aumentar a expressão de genes relacionados com a via de sinalização de BMP/TGF- β , principalmente aqueles relacionados com a diferenciação osteoblástica, confirmando os achados na literatura do *cross-talk* entre essas vias (Herpin et al., 2007; Chen G et al., 2012). Além da ativação de vários componentes dessa via, como *Tgf- β -1, -2 e -3*, *Bmp-1, -2, -5, -6, -7 e -9* e seus receptores e sinalizadores intracelulares (*Smad-2, -3 e -4*), os fatores de transcrição, *Runx2* e *Sox4*, envolvidos com a diferenciação osteoblástica, estavam aumentados. A expressão de *Igf-1*, associada ao aprimoramento do potencial osteogênico da BMP-9 (Chen et al., 2016) e de *Igfbp3*, responsável por modular a atividade anabólica das BMPs, também estavam aumentadas (Gabbitas et al., 1995; Canalis et al., 2003). A diminuição da regulação do gene *Bambi* (*Bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor*), receptor antagonista que regula negativamente a via de sinalização de BMP/TGF- β , provocou, conseqüentemente, maior ativação dessa via (Bai et al., 2017).

Tanto a atividade de ALP quanto a mineralização de matriz extracelular foram maiores nas CTM-VPR-BMP-9 quando comparadas às CTM-VPR crescidas em meio de crescimento. Esses achados são corroborados por outros estudos que confirmam o potencial osteogênico da BMP-9 (Lauzon et al., 2014; Wang et al., 2013). Mesmo em condições não osteogênicas, uma pequena diferenciação osteoblástica foi observada em CTM-VPR, o que provavelmente ocorre devido à presença de SFB no meio de cultura.

CONCLUSÃO

A sobre-expressão de BMP-9 por edição gênica é capaz de produzir células com maior potencial de diferenciação osteoblástica, o qual ocorre, em parte, pela ativação da via de sinalização de BMP/TGF- β . Esses achados sugerem que a terapia celular associada à edição gênica pode ser uma alternativa promissora para aumentar a capacidade de regeneração óssea.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Declaro não existir conflito de interesse.

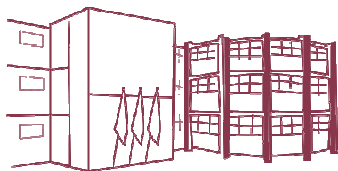
REFERÊNCIAS

1. Akan A, Ozturk S, Sahin I, Gurses S, Ural AU, Oren NC, Isik S. Biomechanical analysis of the effect of mesenchymal stem cells on mandibular distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg.* 2013; 24:169-175.
2. Bai L, Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Chu G, Leung PCK, Yang G. SMAD1/5 mediates bone morphogenetic protein 2-induced up-regulation of BAMBI expression in human granulosa-lutein cells. *Cell Signal.* 2017 Sep;37:52-61. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.05.017. Epub 2017 May 31. PMID: 28578012.
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 23:1709-12.
4. Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng.* 2013; 6:32-52.
5. Bergeron E, Senta H, Mailloux A, Park H, Lord E, Faucheux N. Murine preosteoblast differentiation induced by a peptide derived from bone morphogenetic proteins-9. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15:3341-3349.
6. Bonilla-Claudio M, Wang J, Bai Y, Klysik E, Selever J, Martin JF. Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development.* 2012; 139:709-719.
7. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010; 224:1329-1343.
8. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24:218–35.
9. Chen L, Zou X, Zhang RX, Pi CJ, Wu N, Yin LJ, et al. IGF1 potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells through the enhancement of BMP/Smad signaling. *BMB Rep.* 2016;49:122–7.
10. Chengcheng D, Qiang C, Piao Z, Claire W, Zhenglin Z, Xiangdong W, Shengqiang G, Bowen C, Jing Z, Wei H, Junyi L. LncRNA H19 mediates

- BMP9-induced angiogenesis in mesenchymal stem cells by promoting the p53-Notch1 angiogenic signaling axis. *Genes & Diseases*. 2023; 10, 1040-1054.
11. Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Abuna RPF, Gimenes R, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. *Calcif Tissue Int*. 2017; 101:312-320.
 12. Gabbitas B, Canalis E. Bone morphogenetic protein-2 inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures. *Endocrinology*. 1995;136:2397-403.
 13. Guiqian C, Chuxia D, Yi-Ping L. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences*. 2012; 8(2):272-288. doi: 10.7150/ijbs.2929
 14. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; a:87:1430-1437.
 15. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; b:87:896-902.
 16. Herpin A, Cunningham C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J*. 2007; 274:2977-2985.
 17. Herrera B, García-Álvaro M, Cruz S, Walsh P, Fernández M, Roncero C, Fabregat I, Sánchez A, Inman GJ. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2013; 8:e69535.
 18. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, Mccarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001; 97:1227-1231.
 19. Lamplot JD, Qin J, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Tomal J, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*. 2013; 2:1-21.

20. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7:1–16.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.
22. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HC, Lee SY. A multicenter, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009;12:10-20.
23. Lauzon MA, Daviau A, Drevelle O, Marcos B, Fauchoux N. Identification of a growth factor mimicking the synergistic effect of fetal bovine serum on BMP-9 cell response. *Tissue Eng Part A.* 2014;20:2524-2535.
24. Liao HT, Chen CT, Chen CH, Chen JP, Tsai JC. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *J Trauma.* 2011;70:228-37.
25. Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2013;93:299–306.
26. Moshiri A, Shahrezaee M, Shekarchi B, Oryan A, Azma K. Threedimensional porous Gelapin-Simvastatin scaffolds promoted bone defect healing in rabbits. *Calcif Tissue Int.* 2015b;96:552–564.
27. Mostafa S, Pakvasa M, Coalson E, Zhu A, Alverdy A, Castillo H, et al. The wonders of BMP9: From mesenchymal stem cell differentiation, angiogenesis, neurogenesis, tumorigenesis, and metabolism to regenerative medicine. *Genes Dis.* 2019 Jul 24;6(3):201-223. doi: 10.1016.
28. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108:17–29.
29. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014b;9:9–18.
30. Porcù E, Maule F, Boso D, Rampazzo E, Barbieri V, Zuccolotto G, et al. BMP9 counteracts the tumorigenic and pro-angiogenic potential of glioblastoma. *Cell*

- Death Differ. 2018 Nov;25(10):1808-1822. doi: 10.1038/s41418-018-0149-9. Epub 2018.
31. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2016;101:213-215.
 32. Senta H, Park H, Bergeron E, Drevelle O, Fong D, Leblanc E, Cabana F, Roux S, Grenier G, Faucheux N. Cell responses to bone 12 morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. Cytokine Growth Factor Rev. 2009;20:213-222.
 33. Singhatanadgit W, Olsen I. Endogenous BMPR-IB signaling is required for early osteoblast differentiation of human bone cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011;47:251-259.
 34. Souza ATP, Bezerra BLS, Oliveira FS, Freitas GP, Trevisan RLB, Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. J Cell Biochem. 2018;119:8441–8449.
 35. Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. Cytotherapy. 2018;20:1267-1277.
 36. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965;150:893-899.
 37. Wang Y, Hong S, Li M, Zhang J, Bi Y, He Y, et al. Noggin resistance contributes to the potent osteogenic capability of BMP9 in mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 2013;31:1796-1803.
 38. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. J Med Genet. 2015;52:289-296.
 39. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. Tissue Eng. 2004;10:955-964.
 40. Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. J Orthop Res. 2009;27:442-446.
 41. Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. Dev Biol. 2005;284:1-11.
 42. Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, Rao Z, Li H, et al. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple 13 genes in the brain using CRISPR–dCas9-activator transgenic mice. Nat Neurosci. 2018;21:440–446.



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 536ª Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP