

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

Isabella Cristine Dos Santos

**EFEITO DA SOBRE-EXPRESSÃO DE BMP-9 POR CRISPR/CAS9 EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Ribeirão Preto

2022

ISABELLA CRISTINE DOS SANTOS

Efeito da sobre-expressão de BMP-9 por CRISPR/Cas9 em células-tronco mesenquimais na regeneração óssea

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP- USP) como parte das exigências para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2022

ISABELLA CRISTINE DOS SANTOS

Efeito da sobre-expressão de BMP-9 por CRISPR/Cas9 em células-tronco mesenquimais na regeneração óssea

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP- USP) como parte das exigências para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Aprovado em:

Banca examinadora:

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Dedico esse trabalho à Deus, por me proporcionar tantas bênçãos e sempre me acompanhar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por todas as bênçãos concedidas.

À minha mãe Isabel Cristina Dos Santos, por nunca medir esforços para me proporcionar a melhor educação possível e sempre acreditar nos meus sonhos.

À minha avó Maria Aparecida Pêgolo Dos Santos, por sempre cuidar de mim e por todo o apoio nos meus estudos.

Ao meu irmão Giancarlo Dos Santos, por toda proteção e apoio para a minha formação.

Ao meu noivo Raul Alamino Veiga, por todo amor, cuidado, compreensão e incentivo. Agradeço por sempre estar ao meu lado e nunca desistir de mim.

Às amigas incríveis que fiz ao longo do curso, em especial, Ana Paula Valladares, Gabriela Carmozini e Gabriela Hernandez. Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida e por todo o apoio durante esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por todo o apoio e ensinamentos, e por acreditar em mim, possibilitando a minha entrada no grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, Gileade P. Freitas, Helena B. Lopes, Alann T.P Souza, colaboradores desse trabalho, pela orientação e ensinamentos, esse trabalho não seria possível sem vocês.

Ao grupo de pesquisa “Bone Research Lab”, por toda a ajuda e orientação dos professores, técnicos e pós-graduandos do laboratório.

Aos demais professores, agradeço por todo o ensinamento transmitido e por todo o carinho, vocês foram fundamentais para a concretização dessa vitória.

À faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e todos os seus funcionários, por terem me proporcionado anos incríveis, muito aprendizado e grandes amigas.

Por fim, agradeço à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2019/18550-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros; só é preciso se lembrar de acender a luz.” (Rowling 2000).

RESUMO

O osso é um tecido com grande capacidade de regeneração, mas em algumas situações, a extensão da injúria impede o reparo do tecido. Nesse cenário, a terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs) tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa por ser uma alternativa promissora em relação aos tratamentos existentes. As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são citocinas pertencentes à família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Dentre as diversas BMPs identificadas, a proteína óssea morfogenética 9 (BMP-9) é considerada uma das mais osteogênicas e ainda pouco explorada. Nesse contexto, a estratégia de terapia celular com CTMs modificadas geneticamente para super-expressar BMP-9, utilizando agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente inter espaçadas (CRISPR-Cas9), torna-se uma alternativa viável para ser investigada no reparo de defeitos ósseos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de injeções locais de CTMs imortalizadas superexpressando BMP-9 (iCTMs-VPR^{BMP-9+}) na regeneração do tecido ósseo. Para isso, iCTMs-VPR^{BMP-9+} foram cultivadas em meio de crescimento por 10 dias. Para a regeneração do tecido ósseo, as iCTMs-VPR^{BMP-9+} foram injetadas diretamente em defeitos ósseos (5 mm de diâmetro) criados em calvárias de ratos (5×10^6 células/defeito). Ao final de 4 semanas, os animais foram eutanasiados e as amostras foram avaliadas por análise microtomográfica e histológica. Os resultados mostraram que os defeitos ósseos da calvária de ratos tratados com injeção de iCTMs-VPR^{BMP-9+} exibiram maior formação óssea e densidade mineral óssea quando comparados com defeitos injetados com iCTMs-VPR e solução salina tamponada com fosfato (PBS). Esses resultados indicam que empregar CTMs geneticamente editadas para sobre-expressar BMP-9 aumenta o reparo ósseo, abrindo novas possibilidades para o uso da terapia celular no tratamento de defeitos ósseos.

Palavras-chave: terapia celular, células-tronco mesenquimais, BMP-9, defeito ósseo.

ABSTRACT

Bone is a tissue with great capacity for regeneration, but in some situations, the extent of the injury prevents tissue repair. In this scenario, cell therapy using bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) has attracted the attention of several research groups as it is a promising alternative to existing treatments. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are cytokines belonging to the transforming growth factor beta (TGF- β) family and are involved in several biological processes, including osteoblastic differentiation and bone formation. Among the various BMPs identified, bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) is considered one of the most osteogenic and still poorly explored. In this context, the cell therapy strategy with genetically modified MSCs to overexpress BMP-9, using clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9), becomes a viable alternative to be investigated in the repair of bone defects. Therefore, the aim of this project is to evaluate the effect of local injections of MSCs-BMP9 on bone tissue regeneration. For this, CTMs-BMP9 will be cultivated in growth medium for 10 days. For bone tissue regeneration, MSCs-BMP9 will be injected directly into bone defects (5 mm in diameter) created in rat calvaria (5×10^6 cells/defect). At the end of 4 weeks, the animals will be euthanized and the samples will be evaluated by microtomographic analysis. Quantitative data will be submitted to the normal curve adherence test to determine the appropriate statistical test, and the significance level will be 5%. The results of this study may establish new parameters regarding cell therapy to regenerate bone tissue.

Keywords: cell therapy, mesenchymal stem cells, BMP-9, bone defect.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
	2.1 Cultura e expansão das CTMs e CTMs-BMP9.....	12
	2.2 Criação dos defeitos ósseos na calvária	12
	2.3 Injeção de células no defeito ósseo	13
	2.4 Análise microtomográfica	14
	2.5 Análise histológica.....	14
	2.6 Análise estatística.....	15
3	RESULTADOS.....	15
	3.1 Efeito de iCTMs-VPR BMP-9 + na formação óssea	15
4	DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO.....	19
	REFERÊNCIAS.....	19

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos milhões de pessoas sofrem com perdas de tecidos e/ou órgãos para as quais os tratamentos mais comumente empregados são o transplante de órgãos, a reconstrução cirúrgica ou a utilização de aparatos mecânicos (GOLDSTEIN et al., 2012; PEPPER, 2012; ZHENG et al., 2012). O tecido ósseo apresenta grande capacidade de regeneração quando lesado por traumas, processos infecciosos ou neoplasias. No entanto, em algumas situações a extensão do dano ultrapassa a capacidade de regeneração do tecido, como por exemplo, em 5% das fraturas traumáticas (BRYDONE et al., 2010). Para tais casos, são necessárias intervenções e frequentemente utilizam-se enxertos, que podem ser autógenos, alógenos ou aloplásticos. Apesar do relativo sucesso desses tratamentos, o uso de enxertos está associado a morbidades, tais como a necessidade de mais de uma área cirúrgica e a possibilidade de transmissão de doenças (ZWINGENBERGER et al., 2012; YOUNGER et al., 1989). Nesse cenário, estratégias de terapia celular têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa. O interesse da comunidade científica pelo uso de células na regeneração óssea, em grande parte, originou-se a partir dos estudos realizados pelo grupo liderado por Alexander Friedenstein, que primeiro identificou a presença de células-tronco na medula óssea, e pela comprovação de que essas são as células que participam do processo de reparo de fraturas ósseas (BIANCO et al., 2008; TAGUCHI et al., 2005). Dentre as várias denominações que essas células receberam, células-tronco mesenquimais (CTMs) tornou-se a mais popular e amplamente utilizada (AUBIN, 2008).

Um dos primeiros trabalhos sobre o uso da terapia celular para regeneração óssea relata a infusão intravenosa de medula óssea para o tratamento de crianças com osteogênese imperfeita (HORWITZ et al., 2001). O tratamento de fraturas não consolidadas utilizando aspirados de medula óssea, com maior concentração de células mononucleares, injetados diretamente no sítio da fratura foi bem-sucedido em 53 pacientes de uma amostra de 60 (HERNIGOU et al., 2005a; HERNIGOU et al., 2005b).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que injeções de CTMs derivadas de medula óssea em defeitos ósseos de calvária de ratos resultaram em expressiva formação óssea, no entanto, sem regenerar o defeito ósseo (FREITAS et al., 2019). Nesse

contexto, uma estratégia com potencial para induzir a completa regeneração do defeito ósseo, nesse modelo experimental, seria o uso de CTMs modificadas por pré-tratamentos (mediadores e citocinas inflamatórias, drogas, biomateriais, fatores de crescimento, hipóxia etc.) ou geneticamente editadas para sobre-expressar fatores de crescimento.

Dentre os fatores de crescimento, as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP, do inglês *bone morphogenetic protein*) são membros da família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β), que têm entre seus membros potentes agentes osseoindutores (BONILLA-CLAUDIO et al., 2012; SINGHATANADGIT& OLSEN, 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, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) (HERPIN& CUNNINGHAM, 2007; ZHANG & LI, 2005). Dentre as BMPs, 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). Em estudo utilizando fibroblastos embrionários e células das linhagens C2C12 e C3H10T1/2, foi demonstrado que a BMP-9 é mais resistente à ação inibitória do antagonista extracelular noggin, o que explicaria seu efeito osseoindutor maior, quando comparado ao das BMP-2, -4, -6 e -7 (WANG et al., 2013).

Considerando o acima exposto, neste estudo avaliamos a hipótese de que CTMs superexpressando BMP-9 aumentam a formação óssea quando diretamente injetadas em defeitos em calvária de ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos in vivo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA FORP-USP nº 2018.1.30.58.8).

2.1 Cultura e expansão das iCTMs-VPR e iCTMs-VPR^{BMP-9+}

Todas as células utilizadas nesse estudo foram produzidas pelo Dr. Gileade Pereira Freitas no Departamento de Bioquímica da Universidade de Vermont, EUA, sob supervisão da Prof. Dra. Jane Lian, e gentilmente cedidas para a realização desses experimentos. Brevemente, CTMs da medula óssea de camundongos foram imortalizadas pela superexpressão de telomerase e, em seguida, geneticamente editadas pela técnica de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Para isso, após o processo de imortalização celular (iCTMs), as iCTMs foram transfectadas para expressar dCas9-VPR (iCTMs-VPR) para, em seguida, serem transfectadas para sobre-expressar BMP-9 (iCTMs-VPR^{BMP-9+}). Ambas as iCTMs (iCTMs-VPR e iCTMs-VPR^{BMP-9+}) foram cultivadas em meio de cultura α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies) em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) por 10 dias para permitir a sua expansão. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana

2.2 Criação dos defeitos ósseos na calvária

Trinta e seis *Rattus Norvegicus* da linhagem Wistar com 4 semanas, pesando aproximadamente 150-200g, foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos nas calvárias com diâmetro de 5 mm. Para isso, os animais foram anestesiados com solução anestésica de Coopazine (Xilazina, Agibrands do Brasil Ltda, Brasil) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - e Dopalen (Ketamina,

Agibrands) - anestésico geral - na proporção de 6 mg/kg de peso corporal de Xilazina e 75 mg/kg de peso corporal de Ketamina, injetada por via intraperitoneal. Foi realizada analgesia pré-operatória com Flunixinina Meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Após tricotomia e anti-sepsia com solução de iodo-povidine não alcoólica na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados, 1 cm, ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi descolado e o defeito, produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral tem como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral (Gomes & Fernandes, 2011). A pele foi então suturada com mononylon 4.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e os animais medicados com dose única de anti-inflamatório não esteróide Flunixinina Meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Schering, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Dihidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Os ratos foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água “ad libitum” e ficaram sob observação constante, fazendo-se a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

2.3 Injeção de células nos defeitos ósseos

Para imitar um defeito ósseo pré-existente, a injeção de células foi realizada 2 semanas após a criação do defeito. Para isso, os ratos (n = 12 para cada tratamento) foram anestesiados novamente e foi feita a injeção local com 50 µL de PBS (Gibco Life-Technologies) contendo 5×10^6 iCTMs-VPR ou iCTMs-VPR^{BMP-9+} ou sem células usando uma micropipeta acoplada a uma agulha de calibre 21G. O local de inserção da agulha estava a aproximadamente 1 cm de distância da borda do defeito ósseo. Em seguida, a agulha foi movida na direção ântero-posterior do animal, tangente à calota craniana até que sua ponta atingisse o centro do defeito ósseo, com o bisel voltado para ventral. Quatro semanas após a injeção, os ratos foram eutanasiados

com dose excessiva de Tiopental Sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) na dosagem de 100-120 mg/Kg associado à Lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Brasil) na dosagem de 1 mg/Kg, via intraperitoneal. Em seguida, as calvárias foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% e processados para avaliação da formação óssea por microtomografia computadorizada (μ CT) e análise histológica.

2.4 Análise microtomográfica (μ CT)

As calvárias foram fixadas em solução de formol 4% tamponado (pH=7) por 48 horas e transferidas para uma solução de etanol 70%, onde permaneceram por 3 dias. A análise foi realizada no micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1 μ m. Os dados foram adquiridos por um software de aquisição de imagens 2D do próprio equipamento e as reconstruções 3D, necessárias para a análise, foram feitas pelo software NRecon. Após as reconstruções, foram analisados, dentro da área de interesse, ou seja, a região dos defeitos ósseos produzidos, os seguintes parâmetros: volume ósseo (mm^3), porcentagem de volume ósseo (%), superfície óssea (mm^2), espessura trabecular (mm), número trabecular (1/mm), separação trabecular (mm) e densidade mineral óssea. Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (Parfitt et al., 1987).

2.5 Análise histológica

Após a μ CT, as amostras de calvária foram processadas para análise histológica. Resumidamente, foram descalcificadas, desidratadas e diafanizadas com ácido etilenodiaminotetracético 4% (EDTA, Merk, Alemanha), uma sequência de álcoois e xilol, respectivamente. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo de 5 μ m de espessura, montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram adquiridas em microscópio de luz acoplado a câmera digital DFC310 FX (Leica Microsystems) e um leitor cego realizou a descrição histológica.

2.6 Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn e análises de correlação usando o coeficiente de correlação de Spearman foram realizadas para avaliar os parâmetros morfométricos gerados por μ CT (n = 12). A significância estatística foi definida para 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da injeção de células nos defeitos ósseos

As imagens de μ CT reconstruídas em 3D demonstraram que os defeitos injetados com iCTMs VPR^{BMP-9+} exibiram maior formação óssea em comparação com iCTMs-VPR e PBS (Figura 1A-C). Os parâmetros morfométricos gerados pela imagem μ CT revelaram que volume ósseo (Figura 1D, $p = 0,001$), porcentagem de volume ósseo (Figura 1E, $p = 0,001$), superfície óssea (Figura 1F, $p = 0,002$) e densidade mineral óssea (Figura 1I, $p = 0,001$) foram todos maiores nos defeitos da calvária tratados com iCTMs-VPR^{BMP-9+} em comparação com iCTMs-VPR ou PBS. A espessura trabecular (Figura 1G, $p = 0,001$) foi maior nos defeitos da calvária tratados com iCTMs-VPR do que PBS. O número de trabéculas (Figura 1H, $p = 0,003$) foi maior nos defeitos da calvária tratados com iCTMs-VPR^{BMP-9+} do que iCTMs-VPR. Houve correlação positiva entre os defeitos injetados com PBS, iCTMs-VPR ou iCTMs-VPR^{BMP-9+}, para os seguintes parâmetros morfométricos: volume ósseo (Figura 1D, $r_s = 0,835$, $p = 0,001$), porcentagem de volume ósseo (Figura 1E, $r_s = 0,865$, $p = 0,001$), superfície óssea (Figura 1F, $r_s = 0,413$, $p = 0,012$), número de trabéculas (Figura 1H, $r_s = 0,357$, $p = 0,033$) e densidade mineral óssea (Figura 1I, $r_s = 0,662$, $p = 0,001$).

Em concordância com resultados encontrados pela μ CT, as análises histológicas demonstraram que os defeitos injetados com iCTMs VPR^{BMP-9+} exibiram maior formação óssea em comparação com iCTMs-VPR e PBS (Figura 2A-C). Em geral, os defeitos injetados com PBS foram preenchidos com tecido conjuntivo (Figura 2D). Independentemente do tratamento com iCTMs-VPR ou iCTMs-VPR^{BMP-9+}, o novo osso exibiu características histológicas semelhantes com a presença de tecido ósseo,

osteócitos, osteoblastos (Figura 2E), osso lamelar, estrutura de interface e células de revestimento ósseo (Figura 2F).

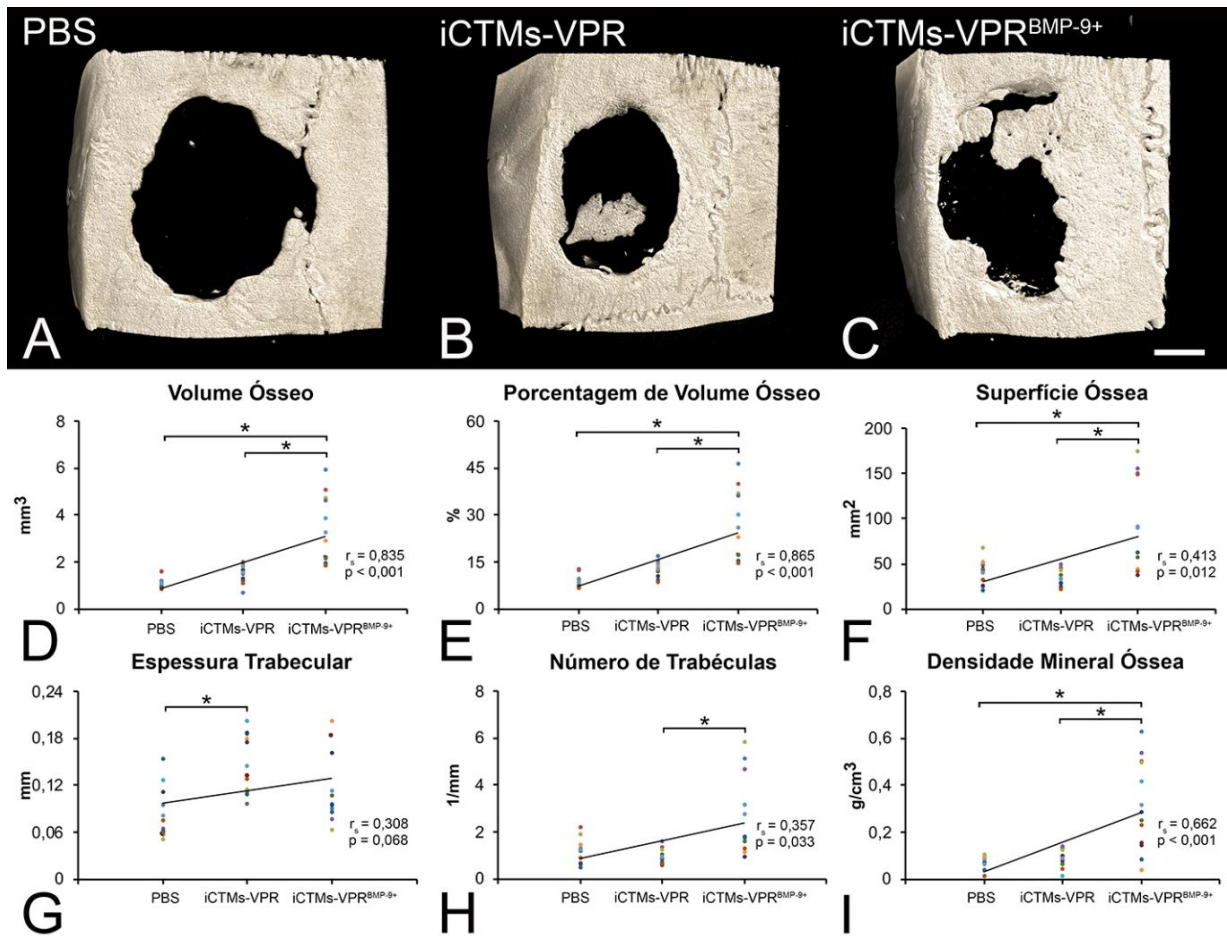


Figura 1. Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea imortalizadas (iCTMs) superexpressando BMP-9 na formação óssea em defeitos calvários de ratos: análise por μ CT. Imagens tridimensionais de μ CT reconstruídas e parâmetros morfométricos de novo tecido ósseo formado em defeitos calvários de ratos tratados com veículo de tampão fosfato-salino (PBS, Controle, A), iCTMs expressando dCas9-VPR constitutivo (iCTMs-VPR, B) ou iCTMs-VPR superexpressando BMP-9 (iCTMs-VPR^{BMP-9+}, C) em 4 semanas após a injeção. Volume ósseo (D), porcentagem de volume osseo (E), superfície óssea (F), espessura trabecular (G), número trabecular (H) e densidade mineral óssea (I). Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, $n = 12$) entre PBS, iCTMs-VPR e iCTMs-VPR^{BMP-9+}. Barra de escala: A-C = 500 μ m.

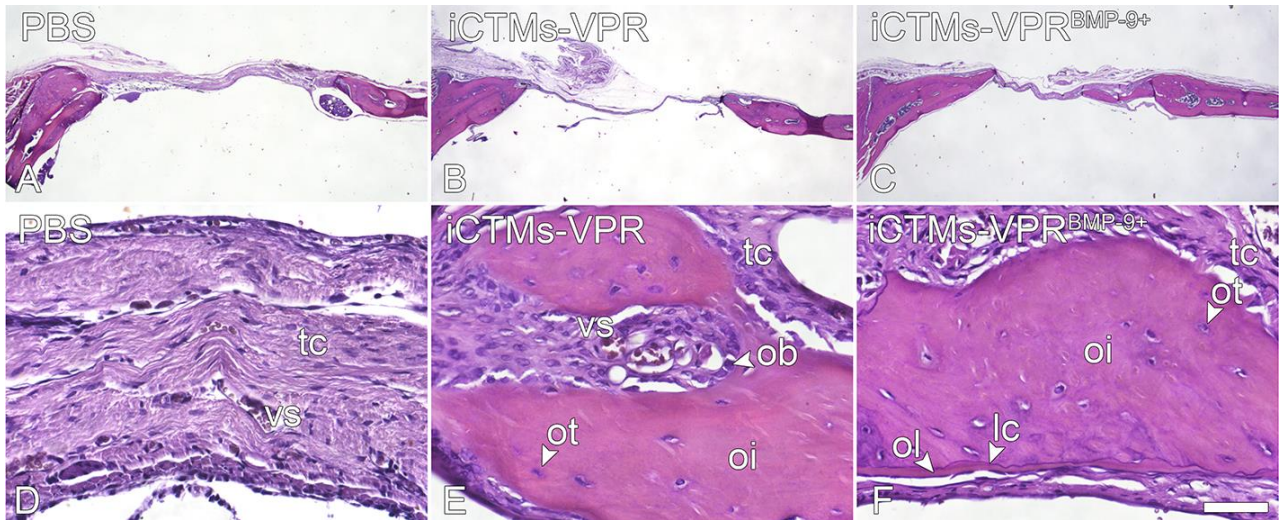


Figura 2. Efeito das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea imortalizadas (iCTMs) superexpressando BMP-9 na formação óssea em defeitos calvários de ratos: análise histológica. Microscopia de luz de novos tecidos formados em defeitos da calvária de ratos tratados com solução veículo de tampão fosfato-salino (PBS, Controle, A, D), iCTMs que expressam um dCas9-VPR constitutivo (iCTMs-VPR, B, E) ou iCTMs-VPR superexpressando BMP-9 (iCTMs-VPR^{BMP-9+}, C, F) 4 semanas após a injeção. Novo tecido ósseo foi observado nos defeitos tratados com iCTMs-VPR (B, E) e iCTMs-VPR^{BMP-9+} (C, F), enquanto os defeitos tratados com PBS foram preenchidos com tecido conjuntivo (A, D). Coloração por hematoxilina e eosina. vs: vaso sanguíneo; tc: tecido conjuntivo; ot: osteócito; ob: osteoblasto; oi: osso imaturo; ol: osso lamelar; lc: linha cementária. Barra de escala: A-C = 1,25 mm; D-F = 50 μ m.

4 DISCUSSÃO

A BMP-9 foi descrita como a de maior potencial osteogênico dentre as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (HERRERA et al., 2013; WANG et al., 2013). Além disso, ela demonstra um potencial angiogênico por provocar, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais e estruturas vasculares e, *in vivo*, a angiogênese (SUZUKI et al.; CHAPPELL e BAUTCH, 2010; YE e JIANG, 2016). Baseado nesses achados, CTMs sobre-expressando a BMP-9 mostram-se como uma possibilidade de uso na terapia celular para regeneração de defeitos ósseos (FREITAS et al., 2021). Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar o efeito de injeções locais de CTMs superexpressando BMP-9 na regeneração do tecido ósseo.

Neste estudo, usamos uma linhagem de CTMs imortalizadas que foi editada para sobre-rexpressar BMP-9 pela tecnologia CRISPR-Cas9 e aplicada em terapia celular para reparar defeitos ósseos. Os resultados *in vivo* suportaram nossa hipótese de que iCTMs-VPR^{BMP-9+} injetadas localmente podem melhorar o reparo ósseo em

defeitos ósseos preexistentes, conforme demonstrado por parâmetros morfométricos gerados pelo μ CT e análise histológica.

São muitas as vantagens da utilização do sistema CRISPR-Cas9, que incluem metodologia fácil e rápida, baixo custo e alta taxa de sucesso (KLEINSTIVER et al., 2016). O sistema CRISPR-Cas9 requer dois componentes, a endonuclease Cas9 e o RNA guia (MALI et al., 2013). Vários grupos de pesquisa desenvolveram complexos CRISPR-Cas9 que ativam regiões codificantes de interesse introduzidas no genoma denominado CRISPR ativação (CRISPRa). Neste estudo, para promover CRISPRa, usamos dCas9-VPR (HO et al., 2017) para sobre-expressar BMP-9 em CTMs previamente imortalizadas. Para documentar a edição de genes com sucesso, as iCTMs-VPR^{BMP-9} foram caracterizadas pela expressão gênica de BMP-9, alguns de seus alvos, a via de sinalização de BMP e diferenciação osteoblástica (FREITAS et al., 2020). No entanto, esses resultados não serão expostos, uma vez que, o objetivo do presente projeto foi apenas a avaliação *in vivo*.

Para começar a abordar a aplicação clínica, iCTMs-VPR^{BMP-9+} foram usadas em terapia celular para reparar defeitos ósseos. Para este protocolo, criamos um defeito e, após 2 semanas, foi realizada a injeção de 5×10^6 células através de uma agulha 21G, no qual não afeta a viabilidade celular (FREITAS et al., 2019). A comparação dos efeitos de iCTMs-VPR^{BMP-9+} e iCTMs-VPR na formação óssea demonstrou que a superexpressão de BMP-9 aumenta a formação óssea. Cinco dos seis parâmetros foram aumentados em defeitos tratados com iCTMs-VPR^{BMP-9+} e este achado é corroborado pelas correlações positivas entre PBS, iCTMs-VPR e iCTMs-VPR^{BMP-9+}. Significativamente, a densidade mineral óssea do osso formado por células da superexpressão de BMP-9 foi muito semelhante à densidade mineral óssea do osso calvarial puro (ALMEIDA et al., 2019). Isso é biologicamente e clinicamente relevante, pois a densidade mineral óssea é uma referência para avaliar a qualidade óssea (BOUXSEIN et al., 2010), e nossos resultados indicam que além de aumentar a quantidade de formação óssea, as iCTMs-VPR^{BMP-9+} induzem a formação de tecido ósseo semelhante em qualidade ao osso preexistente. Esses achados de μ CT foram corroborados por análise histológica que confirmou a presença de mais tecido ósseo nos defeitos onde foram injetados as iCTMs-VPR^{BMP-9+} em comparação com iCTMs-VPR e PBS. Além disso, não foram observados indicadores inflamatórios em nenhum

dos cortes histológicos. Estes resultados suportam estudos anteriores sobre o efeito positivo de BMP-9 na formação óssea, seja diretamente incorporado em estruturas ou em combinação com estruturas carregadas com células transduzidas com BMP-9 (DUMANIAN et al., 2017; LEE et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Os mecanismos que conduzem a expressão de BMP-9 para aumentar a formação óssea ainda precisam ser estudados. No entanto, levando em consideração que os efeitos terapêuticos das CTMs dependem de seus produtos secretados, que incluem fatores de crescimento, citocinas, hormônios, e a liberação de vesículas extracelulares, bem como as interações célula-célula (SPEES et al., 2016), é razoável antecipar que esses mecanismos podem mediar a capacidade das iCTMs- VPR^{BMP-9+} de aumentar e / ou acelerar a formação óssea. A presença de iCTMs-VPR^{BMP-9+} em defeitos ósseos pode ter resultado em uma resposta inflamatória limitada, o que facilita a osteogênese e angiogênese, contribuindo fisiologicamente para o reparo ósseo (SHAO et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

Sabe-se que esta foi a primeira demonstração de que as CTMs podem ser geneticamente modificadas para sobre-expressar BMP-9. Esses resultados indicam que empregar CTMs geneticamente editadas para sobre-expressar BMP-9 aumenta o reparo ósseo, abrindo novas possibilidades para o uso da terapia celular no tratamento de defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS

- AUBIN JE. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Principles of bone biology, John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz and T. John Martin, eds. 3rd ed. V. I, p.85-107, 2008.
- 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.

BERGERON E, SENTA H, MAILLOUX A, PARK H, LOR E, FAUCHEUX N. Murine preosteoblast differentiation induced by a peptide derived from bone morphogenetic proteins-9. *Tissue Eng Part A* 2009;15:3341-3349.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008;2:313-319.

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.

BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, GULDBERG RE, JEPSEN KJ, MULLER R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. PMID: 20533309.

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.

DUMANIAN ZP, TOLLEMAR V, YE J, LU M, ZHU Y, LIAO J, AMEER GA, HE TC, REID RR. Repair of critical sized cranial defects with BMP9-transduced calvarial cells delivered in a thermoresponsive scaffold. *PLoS One.* 2017 Mar 1;12(3):e0172327. doi: 10.1371/journal.pone.0172327. PMID: 28249039; PMCID: PMC5332017.

FREITAS GP, LOPES HB, SOUZA ATP, OLIVEIRA PGFP, ALMEIDA ALG, SOUZA LEB, COELHO PG, BELOTI MM, ROSA AL. Cell Therapy: Effect of Locally Injected Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow or Adipose Tissue on Bone Regeneration of Rat Calvarial Defects. *Sci Rep.* 2019a Sep 17;9(1):13476. doi: 10.1038/s41598-019-50067-6. PMID: 31530883; PMCID: PMC6748998.

FREITAS GP, LOPES HB, P SOUZA AT, F P OLIVEIRA PG, ALMEIDA AL, COELHO PG, FERREIRA FU, COVAS DT, BELOTI MM, ROSA AL. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. *Regen 23 Med.* 2019b Dec;14(12):1107-1119. doi: 10.2217/rme-2019-0036. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31960753.

FREITAS GP, SOUZA AT, LOPES HB, TREVISAN RL, OLIVEIRA FS, FERNANDES RR, FERREIRA FU, ROS FA, BELOTI MM, ROSA AL. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Culture, Characterization and Differentiation. *Bioprotocol.* 2020 Feb 10(4): e3534. doi: 10.21769/BioProtoc.3534.

GOLDSTEIN MJ, LUBEZKY N, YUSHKOV Y, BAE C, GUARRERA JV. Innovations in organ donation. *Mt Sinai J Med* 2012;79:351-364.

GOMES PS, FERNANDES MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *LabAnim* 2011;45:14-24.

HERNIGOU P, POIGNARD A, BEAUJÉAN F, ROUARD H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005a;87:1430-1437.

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* 2005b;87:896-902.

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.

HERRERA B, GARCÍA-ÁLVARO M, CRUZ S, WALSH P, FERNANDEZ M, RONCERO C, FABREGAT I, SÁNCHEZ A, INMAN GJ. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoSOne* 2013;8:e69535.

HORWITZ EM, PROCKOP DJ, GORDON PL, KOO WW, FITZPTARICK LA, NELL 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.

HO SM, HARTLEY BJ, FLAHERTY E, RAJARAJAN P, ABDELAAL R, OBIORAH I, BARRETO N, MUHAMMAD H, PHATNANI HP, AKBARIAN S, BRENNAND KJ. Evaluating Synthetic Activation and Repression of Neuropsychiatric-Related Genes in hiPSC-Derived NPCs, Neurons, and Astrocytes. *Stem Cell Reports*. 2017 Aug 8;9(2):615-628. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.012. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28757163; PMCID: PMC5550013.

KLEINSTIVER BP, PATTANAYAK V, PREW MS, TSAI SQ, NGUYEN NT, ZHENG Z, JOUNG JK. Highfidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016 Jan 28;529(7587):490-5. doi: 10.1038/nature16526. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26735016; PMCID: PMC4851738

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, KONJ Y, DENDULURI S, ROGERS MR, PRATT A, HAYDONN 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.

LAUZON MA, DREYELLE O, DAVIAU A, FAUCHEUX N. Effects of BMP-9 and BMP-2 on the PI3K/Akt Pathway in MC3T3-E1 Preosteoblasts. *Tissue Eng Part A* 2016;22:1075-1085.

LEE CS, BISHOP ES, Dumanian Z, ZHAO C, SONG D, ZHANG F, ZHU Y, AMEER GA, HE TC, REID RR. Bone Morphogenetic Protein-9-Stimulated Adipocyte-Derived Mesenchymal Progenitors Entrapped in a Thermoresponsive Nanocomposite Scaffold Facilitate Cranial Defect Repair. *J Craniofac Surg*. 2019 Sep;30(6):1915-1919. doi: 10.1097/SCS.0000000000005465. PMID: 30896511; PMCID: PMC6746609

MALI P, YANG L, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DICARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):823-6. doi: 10.1126/science.1232033. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23287722; PMCID: PMC3712628.

PARFITT AM, DREZNER MK, GLORIEUX FH, KANIS JA, MALLUCHE H, MEUNIER PJ, OTT SM, RECKR RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610.

PEPPER JR. Update on mechanical circulatory support in heart failure. *Heart* 2012;98:663-669.

SENTA H, PARK H, BERGERON E, DREVELLE O, FONG D, LEBLANC E, CABANA F, ROUX S, GRENIER G, FAUCHEUX N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *CytokineGrowthFactorRev* 2009;20:213-222.

SHAO J, ZHANG W, YANG T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biol Res*. 2015 Nov 3;48:62. doi: 10.1186/s40659-015-0053-4. PMID: 26530042; PMCID: PMC4630918.

SPEES JL, LEE RH, GREGORY CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Aug 31;7(1):125. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7. PMID: 27581859; PMCID: PMC5007684.

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.

TAGUCHI K, OGAWA R, MIGITA M, HANAWA H, ITO H, ORIMO H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *BiochemBiophys Res Commun* 2005;331:31-36.

URIST MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.

WANG Y, HONG S, LI M, ZHANG J, BI Y, HE Y, LIU X, NAN G, SU Y, ZHU G, LI R, ZHANG W, WANG J, ZHANG H, KONG Y, SHUI W, WU N, HE Y, CHEN X, LUU HH, HAYDON RC, SHI LL, HE TC, QIN J. Noggin resistance contributes to the potent osteogenic capability of BMP9 in mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2013;31:1796-1803.

YOUNGER EM, CHAPMAN MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-195.

ZHANG J, LI L. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 2005;284:1-11.

ZHANG R, LI X, LIU Y, GAO X, ZHU T, LU L. Acceleration of Bone Regeneration in CriticalSize Defect Using BMP-9-Loaded nHA/Coll/MWCNTs Scaffolds Seeded with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res Int*. 2019 Apr 11;2019:7343957. doi: 10.1155/2019/7343957. PMID: 31111065; PMCID: PMC6487171.

ZHENG GS, SU YX, LIAO GQ, CHEN ZF, WANG L, JIAO PF, LIU HC, ZHONG YQ, ZHANG TH, LIANG YJ. Mandible reconstruction assisted by preoperative virtual surgical simulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:604-611.

ZWINGENBERGER S, NICH C, VALLADARES RD, YAO Z, STIEHLER M, GOODMAN SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs* 2012;26:245-256.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

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 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **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) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

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

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Isabella Cristine Dos Santos	
Nº USP: 10294623	Período: 9º período
Telefone de contato: (16) 99361-1234	E-mail USP: isabellacristine27@usp.br
<u>INFORMACÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa	
Departamento: DCTBMFP	
Área de conhecimento: Cirurgia	
Subárea: Regeneração óssea	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Adalberto Luiz Rosa, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.

Isabella Cristine Dos Santos

Adalberto Luiz Rosa