

EFEITO DA SOBRE-EXPRESSÃO DE BMP9 POR CRISPR-CAS9 NA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Georgia K. Quiles^{1*}, Gileade P. Freitas², Márcio M. Beloti³, Adalberto L. Rosa³, Helena B. Lopes⁴

1. Aluna de graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP (FORP-USP)
2. Pós-doutorando da FORP-USP
3. Professor titular da FORP-USP
4. Pós-doutoranda da FORP-USP /Orientadora

Resumo

A diferenciação osteoblástica de células-tronco (CTM) é importante para o reparo ósseo, que pode ser induzida pela proteína morfogenética óssea 9 (BMP9). O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da sobre-expressão da BMP9 na diferenciação osteoblástica de CTM. Para isso, CTM sobre-expressando BMP9 (CTM-BMP9) através da técnica de CRISPR-Cas9 foram cultivadas por até 21 dias. Foram avaliadas a expressão gênica de *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, atividade de ALP *in situ*, e formação da matriz mineralizada. CTM foram usadas como controle. Os dados foram analisados por teste T de Student ou ANOVA ($p \leq 0,05$). As CTM-BMP9 apresentaram aumento da expressão gênica de *Runx2* nos dias 3 e 7; *Sp7* nos dias 3, 7 e 10; *Alp* nos dias 3, 7, 10 e 14; atividade de ALP e a matriz mineralizada em todos os períodos avaliados. Concluiu-se que, a sobre-expressão de BMP9 pela técnica CRISPR-Cas9 aumenta o potencial de diferenciação osteoblástica de CTM.

Autorização legal: Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA FORP/USP): 2018.1.30.58.8 .

Palavras-chave: edição gênica; regeneração óssea; osteoblasto

Apoio financeiro: FAPESP

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade de São Paulo (USP)

Introdução

O tecido ósseo possui grande capacidade de reparo, que envolve fases sobrepostas incluindo inflamação, reparo e remodelação, todas dependentes de vias de sinalização intracelular e dos tecidos adjacentes. Quando a extensão da lesão excede a capacidade de regeneração do tecido, outras formas de tratamento são requeridas, entre elas a utilização da terapia celular. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a utilização de CTM derivadas da medula óssea induz formação óssea, porém sem a completa regeneração do defeito¹. Assim, estudos que busquem refinar a técnica de terapia celular objetivando regenerar defeitos ósseos, são necessários.

Nesse contexto, a terapia gênica para sobre-expressar proteínas com potencial osteogênico através de agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente interespaçadas (CRISPR-Cas9) pode ser uma alternativa promissora. A tecnologia CRISPR 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. 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 do DNA com um alto grau de ativação da transcrição proteica de genes alvos^{2,3,4}.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são citocinas pertencentes à família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e têm entre seus membros potentes agentes osseointdutores. Os efeitos das BMPs em células osteoblásticas são amplamente discutidos na literatura. No entanto, a BMP9, que tem ação proliferativa e anti-apoptótica, é considerada uma das mais osteogênicas^{5,6}, mas ainda pouco explorada.

Considerando o acima exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da sobre-expressão de BMP9 através da tecnologia CRISPR-Cas9 na diferenciação osteoblástica de CTM para posterior utilização em terapia celular.

Metodologia

CTM derivada de medula óssea de camundongos C57BL/6 previamente editadas por transdução lentiviral com um vetor dCas9-VPR (CTM controle) e um RNA guia para direcionar o gene BMP9 (CTM-BMP9) foram produzidas através da técnica CRISPR-Cas9, como previamente descrito⁷. Ambas as células foram descongeladas, expandidas e plaqueadas em meio de cultura α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% Strep/Penicilina e 0,3 μ g/mL de fungisona em placas de poliestireno de 24 poços e cultivadas em meio de crescimento (não indutor de osteogênese) por até 21 dias.

A confirmação da sobre-expressão foi avaliada pela expressão gênica de BMP9 aos 3, 7, 10 e 14 dias. O efeito osteogênico foi avaliado pelas expressões gênicas de Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), osterix (*Sp7*) e fosfatase alcalina (*Alp*) por PCR em tempo real ao final de 3, 7, 10 e 14 dias. Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar e normalizados pelo gene constitutivo β -

Actina. A atividade da ALP *in situ* foi avaliada aos dias 3, 7, 10 e 14 por meio da técnica de coloração por Fast Red. Os poços foram lavados com PBS e fotografados. A detecção da formação de matriz mineralizada foi feita aos 21 dias. Para isso, as células foram coradas com vermelho de Alizarina S, lavadas com PBS, observadas por epifluorescência e fotografadas. Foi realizado o cálculo de porcentagem de área mineralizada a partir das imagens obtidas. Todos os dados obtidos foram analisados por teste T de Student ou ANOVA ($p \leq 0,05$; $n=3$).

Resultados e Discussão

A edição das células foi confirmada pelo aumento da expressão gênica de BMP9 aos 3, 7 e 10 dias ($p = 0,001$) nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. Neste estudo, a técnica de CRISPR-Cas9, foi eficaz para sobre-expressar BMP9 em CTM por até 10 dias, representando uma vantagem desta estratégia, uma vez que as CTM foram capazes de produzir um fator osteoindutor por um tempo de meia-vida mais longo quando comparada com outras técnicas já descritas na literatura^{8,9,10}. A expressão gênica de *Runx2* foi maior nos dias 3 e 7 ($p = 0,001$ para ambos) e menor nos dias 10 e 14 ($p = 0,001$ para ambos) nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. A expressão gênica de *Sp7* foi maior nos dias 3, 7 e 10 ($p = 0,001$, $p = 0,001$ e $p = 0,008$, respectivamente) e menor no dia 14 ($p = 0,001$) nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. A expressão gênica de *Alp* foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 ($p = 0,001$ para todos) nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. A atividade de ALP *in situ* foi maior nos dias 3, 7, 10 e 14 nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. Além disso, a maior atividade de ALP nas células CTM controle foi detectada no dia 14, enquanto para as células CTM-BMP9 essa atividade foi maior no dia 10. A matriz extracelular mineralizada foi maior nas CTM-BMP9 comparadas às CTM controle. Esses achados são corroborados por outros estudos que confirmam o potencial osteogênico da BMP9^{6,11,12}.

Conclusões

Estes resultados indicam que CTM geneticamente modificadas para sobre-expressar BMP9 através da tecnologia CRISPR-Cas9, foi capaz de gerar uma linhagem celular com potencial de diferenciação osteoblástica aumentado *in vitro*. Portanto, terapia celular baseada no uso células geneticamente modificadas pode ser uma estratégia promissora para tratar defeitos ósseos e abrindo novas possibilidades terapêuticas.

Referências bibliográficas

- 1- Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Souza LEB, et 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*.2019;9:13476.
- 2- Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*.2016;101:213-215.
- 3- 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.
- 4- Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, Rao Z, Li H, et al. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. *Nat Neurosci*.2018;21:440-446.
- 5- Herrera B, Garcia-Álvaro M, Cruz S, Walsh P, Fernández M, Roncero C, et al. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoSOne*.2013;8:e69535.
- 6- 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.
- 7- Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Gomes MPO, Quiles GK, Gordon J, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 by CRISPR-Cas9 present high *in vitro* osteogenic potential and enhance *in vivo* bone formation. *Gene Ther*.2021;10:1038.
- 8- Aslan H, Zilberman Y, Arbeli V, Sheyn D, Matan Y, Liebergall M, et al. Nucleofection-based *ex vivo* nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Eng*.2006;12:877-89.
- 9- Li JZ, Li H, Sasaki T, Holman D, Beres B, Dumont RJ, et al. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther*.2003;10:1735-43.
- 10- Sheyn D, Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, Gazit D, Gazit Z. Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation *in vivo*. *Gene Ther*.2008;15:257-66.
- 11- 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.
- 12- Lauzon MA, Drevelle O, Daviau A, Fauchoux N. Effects of BMP-9 and BMP-2 on the PI3K/Akt Pathway in MC3T3-E1 Preosteoblasts. *Tissue Eng Part A*. 2016;22:1075-85.