



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL



ROBSON DIEGO CALIXTO

**EFEITO DO SECRETOMA PRESENTE NO MEIO CONDICIONADO POR  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS QUE SUPEREXPRESSAM BMP-9 NA  
DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA E NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE  
CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS**

RIBEIRÃO PRETO – SP  
2023



ROBSON DIEGO CALIXTO



Versão Original

**EFEITO DO SECRETOMA PRESENTE NO MEIO CONDICIONADO POR  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS QUE SUPEREXPRESSAM BMP-9 NA  
DIFERENCIAÇÃO OSTEABLÁSTICA E NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE  
CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
(FORP-USP) como exigência para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.

**Programa:** Biologia Oral

**Área de Concentração:** Biologia Oral

**Orientador:** Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

RIBEIRÃO PRETO – SP  
2023

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Calixto, Robson Diego

Efeito do secretoma presente no meio condicionado por células-tronco mesenquimais que superexpressam BMP-9 na diferenciação osteoblástica e no reparo ósseo de defeitos de calvária de camundongos. Ribeirão Preto, 2023.

89 p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP. Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.  
Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

Versão original

1. Célula-tronco mesenquimal; 2. Edição gênica; 3. Osteoblasto; 4. Proteína morfogenética óssea 9; 5. Regeneração óssea; 6. Secretoma celular.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**CALIXTO, RD. Efeito do secretoma presente no meio condicionado por células-tronco mesenquimais que superexpressam BMP-9 na diferenciação osteoblástica e no reparo ósseo de defeitos de calvária de camundongos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Biologia Oral

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedicatória:**

À todos aqueles que sofreram e que ainda sofrem com os impactos da pandemia do coronavírus, principalmente, aos mais de 700 mil brasileiros que tiveram suas vidas interrompidas e que deixaram sua história por trás das estatísticas...

Trabalho realizado junto ao *Bone Research Lab*, nos espaços dos laboratórios de Cultura de Células, de Clonagem Molecular, de Biologia Molecular, de Histologia, LAB 3D BIO e no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Bolsa de Mestrado (Processo nº 2020/06599-5), Estágio de Pesquisa no Exterior (Processo nº 2022/00168-8) e Projeto de Pesquisa – Temático (Processo nº 2017/12622-7).

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, meus agradecimentos são dirigidos a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a concretização de tudo isso.

A Universidade de São Paulo (USP), instituição de grande prestígio internacional, por sua qualidade impar na construção do conhecimento científico em nosso País. E dentro deste pequeno mundo, a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) e o Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral, pelo seu excelente trabalho, seja pelo seu corpo docente ou por toda a equipe de funcionários que trabalham diariamente para que tudo funcione brilhantemente e de maneira notável.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por acreditar na ciência e permitir que pesquisadores dos mais diversos locais tenham a oportunidade de desenvolver trabalhos sólidos, de excelência e com grande impacto social dentro dos diferentes setores.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Mateus Beloti, grande exemplo de pesquisador, por aceitar me orientar e concluir essa fase com grande maestria, comprometimento, paciência e gentileza. Levo comigo grandes aprendizados de cada oportunidade que me foi dada, além de perceber notória evolução em minha trajetória acadêmica frente a seus ensinamentos. Com certeza o objetivo traçado desde nossa primeira reunião foi concretizado, me sinto muito satisfeito.

A todos meus colegas do *Bone Research Lab*, meu grupo de pesquisa, principalmente ao Dr. Adalberto Luiz Rosa, Dr. Gileade Pereira Freitas e Dra. Fabíola Singaretti de Oliveira, por todo ensinamento, entrega, dedicação, companheirismo e cuidado na execução de cada projeto e atividade técnica desenvolvida. Mesmo em meio a tantos costumes e culturas diferentes, em tão pouco tempo, nos tornamos uma grande família.

Ao *Spanish National Cancer Research Centre* (CNIO) e toda a equipe de pesquisadores do “*Telomeres and Telomerase Group*” comandado pela Dra. Maria Blasco, por me receberem de braços abertos e por me ensinarem tanto durante o tempo que estive realizando o estágio de pesquisa no exterior. Sou extremamente honrado por terem me permitido estar em contato direto com o Dr. Shinya Yamanaka, meu maior ídolo da pesquisa, com certeza é um marco que nunca esquecerei.

A minha eterna mãe da ciência, Dra. Rafaela Scariot, e aos demais colegas do serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por toda parceria desde a graduação, escuta e as oportunidades que me trouxeram até aqui. Mesmo

há alguns quilômetros de distância, são essenciais para a construção desse sonho e a finalização dessa etapa.

A Dra. Maria Cristina Borsatto, por todo incentivo, força e cuidado. Obrigado por mostrar que a Odontologia pode ser escrita das mais variadas maneiras, sempre com uma pitada de amor e perseverança. Você é uma grande inspiração.

Aos meus colegas da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná (SESA-PR), principalmente a Monique Costa Budk, que me acompanharam desde o período de preparo para o processo seletivo da pós-graduação até meu momento oficial de partida de Curitiba; os quais, mesmo em meio aos nossos plantões massivos de enfrentamento da pandemia de Covid-19, sempre me permitiram e me incentivaram a continuar estudando.

Aos meus amigos, em especial a Mydia, Valéria, Marcelle, Brenda, Dani, Fernanda, Iasmin, Amanda, Camila, Jaqueline, Jéssica, Lucas e Ademir, por sempre estarem comigo, me ouvindo, me dando forças, me fazendo rir e deixando todo esse processo mais leve. Minha estadia em Ribeirão Preto não seria a mesma sem vocês.

Aos meus pais, Zelei e Ruite, meus maiores exemplos de vida. A vocês sou grato por tudo. É admirável o quanto batalharam, mesmo em frente a todas as dificuldades da vida, para que eu pudesse chegar onde cheguei. Obrigado por sonharem o meu sonho e acreditarem que tudo poderia ser real. Obrigado por me mostrarem que mesmo com pouco, pode-se fazer muito! São meus maiores motivos de continuar nessa luta sem esmorecer. Kocham cię na zawsze!

Enfim, a todos que não consegui citar, mas que sabem do seu papel de importância tanto nesse trabalho quanto na minha vida. É mais um sonho que se realiza e avante para o próximo!



*“A quién le importa lo que yo diga, a quien le importa lo que yo haga. Yo soy así y así  
seguiré, nunca cambiaré”*

Supremme de Luxe

## RESUMO

CALIXTO, RD. **Efeito do secretoma presente no meio condicionado por células-tronco mesenquimais que superexpressam BMP-9 na diferenciação osteoblástica e no reparo de defeitos de calvária de camundongos.** 2023. 89p. Dissertação – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A terapia *cell-free* utilizando o secretoma celular presente no meio condicionado (CM) por células-tronco mesenquimais (MSCs) vem sendo relatadas na literatura científica como uma estratégia terapêutica promissora no campo da medicina regenerativa com vistas ao reparo do tecido ósseo. Este secretoma consiste num conjunto de fatores e moléculas secretadas para o espaço extracelular, o qual permite a comunicação celular, a regulação biológica e a modulação das diversas condições fisiológicas teciduais. Dentre as moléculas secretadas, está a proteína óssea morfogenética 9 (BMP-9), importante componente de tecidos ósseos endocondrais e intramembranosos, relatadas como uma das mais osteoprogenitoras da família das BMPs. Partindo disso, este estudo teve como objetivo investigar o potencial do secretoma presente no CM por células MSCs editadas geneticamente para superexpressão da proteína BMP-9 (CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>) na indução da diferenciação osteoblástica *in vitro* de MSCs primárias e no reparo ósseo *in vivo* em defeitos críticos criados na calvária de camundongos. MSCs foram obtidas da medula óssea (MO) de camundongos machos da linhagem C57BL/6 de 8 semanas da idade e passaram pelo processo de edição gênica por meio da técnica de CRISPR-Cas9, sendo que um grupo foi infectado apenas com o vetor vazio (MSCs<sup>VPR</sup>) enquanto o outro grupo recebeu a combinação da endonuclease SP-dCas9-VPR mais o RNA guia customizado para a superexpressão de BMP-9 com repórter GFP positivo (MSCs<sup>BMP-9</sup>). Após a confirmação da efetividade desse processo por meio na análise da expressão gênica de *Bmp-9* pela técnica de PCR em tempo real e a marcação positiva de GFP por citometria de fluxo, essas células foram utilizadas para o obtenção dos CMs em diferentes tempos. Confirmou-se por meio de teste imunoenzimático de ELISA a presença secretada de BMP-9 nos CMs coletados, sendo que seu maior pico de expressão se deu após 1 hora de cultura sem a presença do soro fetal bovino (SFB), período de eleição do CM a ser utilizado nos experimentos seguintes. Para avaliação do efeito dos CMs sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs, as células foram crescidas em contato com o meio condicionado por MSCs<sup>VPR</sup> (CM-MSCs<sup>VPR</sup>) e por MSCs<sup>BMP-9</sup> (CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>) na proporção 1:1 com o meio de crescimento não indutor fresco (MEM 20%) sempre nas últimas 48 horas que antecediam o experimento a ser realizado. Avaliou-se a capacidade de migração celular pelo método scratch, a viabilidade celular por meio de ensaio

colorimétrico de MTT, a expressão gênica de marcadores ósseos (*Runx2*, *Alp* e *Opn*) por PCR em tempo real, a expressão proteica de marcadores ósseos (RUNX2, ALP e OPN) por western blot e a atividade fenotípica de ALP *in situ* pelo método *Fast Red*. Foi perceptível o efeito positivo de CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs, o qual foi capaz de induzir um perfil osteoblástico fenotípico *in vitro*. Já para a avaliação do efeito dos CMs sobre o reparo ósseo, uma semana após a criação de defeitos críticos de 4 mm criados em calotas cranianas de camundongos, fez-se o tratamento dos defeitos pela injeção de um volume de 25 µL de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. Quatro semanas após o tratamento, percebeu-se por meio das reconstruções tridimensionais da análise morfométrica de µCT, que o tratamento com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> favoreceu a regeneração do tecido ósseo comparado aos defeitos tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup> e os animais que não foram submetidos a nenhum tratamento, gerando um maior volume ósseo, porcentagem de volume ósseo, superfície óssea e um maior número de trabéculas no tecido ósseo *in vivo*. Esses dados foram corroborados pela análise histológica, mostrando que as MSCs editadas geneticamente para superexpressão de BMP-9 foram capazes de formar um tecido ósseo com qualidade semelhante ao osso nativo, sem indicadores inflamatórios. Além disso, também observamos que o tratamento com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> favoreceu a regeneração do tecido ósseo frente a defeitos tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup>. Por fim, este estudo mostrou que o CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> possui alto potencial osteogênico e osteoindutor, sendo uma metodologia interessante para a aplicação clínica no campo da Odontologia e Medicina, na qual, além de suas vantagens a nível molecular para o reparo do tecido ósseo de sítios desafiadores, possui baixo custo da produção e a possibilidade da realização de uma terapia guiada para efeitos terapêuticos específicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Célula-tronco Mesenquimal; Edição Gênica; Osteoblasto; Proteína Morfogenética Óssea 9; Regeneração Óssea; Secretoma Celular.

## ABSTRACT

CALIXTO, RD. **Effect of the secretome present in the conditioned medium of mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 on osteoblast differentiation and bone repair of mouse calvarial defects.** 2023. 89p. Dissertação – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Cell-free therapy using the cellular secretome present in the conditioned medium (CM) of mesenchymal stem cells (MSCs) has been reported in the scientific literature as a promising therapeutic strategy in the field of regenerative medicine with a view to repairing bone tissue. This secretome consists of a set of factors and molecules secreted into the extracellular space, which allows cell communication, biological regulation and modulation of various tissue physiological conditions. Among one of the secreted molecules is the bone morphogenetic protein 9 (BMP-9), important components of endochondral and intramembranous bone tissues, reported as one of the most osteoprogenitor of the BMPs family. Based on this, this study aimed to investigate the potential of the cellular secretome present in the CM by genetically edited MSCs cells for overexpression of the BMP-9 protein in inducing osteoblastic differentiation *in vitro* of primary MSCs and *in vivo* bone repair in critical defects created in the mouse calvarial. MSCs were obtained from the bone marrow of 8-week-old male C57BL/6 mice and underwent the gene editing process using the CRISPR-Cas9 technique, with one group infected only with the empty vector (MSCs<sup>VPR</sup>) while the other group received the combination of SP-dCas9-VPR endonuclease plus the customized guide RNA for the overexpression of BMP-9 with positive GFP reporter (MSCs<sup>BMP-9</sup>). After confirming the effectiveness of this process through the analysis of the gene expression of *Bmp-9* by the PCR technique in real time and the positive labeling of GFP by flow cytometry, these cells were used to obtain the CM in different times. The secreted presence of BMP-9 in the collected CMs was confirmed by means of an ELISA immunoenzymatic test, and its highest expression peak occurred after 1 hour of culture without the presence of fetal bovine serum (FBS), the period of election of the CM to be used in the following experiments. To evaluate the effect of CMs on the osteoblastic differentiation of MSCs, the cells were grown in contact with the CM by MSCs<sup>VPR</sup> (CM-MSCs<sup>VPR</sup>) and by MSCs<sup>BMP-9</sup> (CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>) in the proportion 1:1 with fresh non-inducing growth medium (MEM 20%) always in the last 48 hours before the experiment to be carried out. Cell migration capacity was evaluated by the scratch method, cell viability by MTT colorimetric assay, gene expression of bone markers (*Runx2*, *Alp* and *Opn*) by real-time PCR, protein expression of bone markers (RUNX2, ALP and OPN) by western blot and the phenotypic activity of ALP *in situ* by the Fast Red method. The positive effect of CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> on osteoblastic differentiation

of MSCs was noticeable, which was able to induce a phenotypic osteoblastic profile *in vitro*. As for the evaluation of the effect of CMs on bone repair, one week after the creation of critical defects of 4 mm created in the mouse calvarial, the defects were treated by injecting a volume of 25  $\mu$ L of CM-MSCs<sup>VPR</sup> and CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. Four weeks after the treatment, it was noticed through the three-dimensional reconstructions of the morphometric analysis of  $\mu$ CT, that the treatment with CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> favored the repair of the bone tissue compared to the defects treated with CM-MSCs<sup>VPR</sup> and the animals that were not submitted to no treatment, generating a greater bone volume, percentage of bone volume, bone surface and a greater trabecular number in bone tissue *in vivo*. These data were corroborated by histological analysis, showing that MSCs genetically edited for BMP-9 overexpression were able to form bone tissue with similar quality to native bone, without inflammatory indicators. Furthermore, we also observed that treatment with CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> favored bone tissue repair in comparison of defects treated with MSCs<sup>BMP-9</sup>. Finally, this study showed that CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> has a high osteogenic and osteoinductive potential, being an interesting methodology for clinical application in the field of Dentistry and Medicine, in which, in addition to its advantages at the molecular level for tissue repair challenging sites, has low production cost and the possibility of carrying out a guided therapy for specific therapeutic effects.

**KEYWORDS:** Mesenchymal Stem Cells; Genetic Edition; Osteoblast; Bone Morphogenetic Protein 9; Bone Regeneration; Cellular Secretoma.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **Eficiência da edição gênica de MSCs imortalizadas para a superexpressão de BMP-9 e a sua presença no meio condicionado.** Imagens de microscopia de luz de **A)** MSCs<sup>VPR</sup> e **B)** MSCs<sup>BMP-9</sup> na passagem 16, após coleta do meio condicionado em 1 hora sem soro fetal bovino. **C)** Avaliação da marcação GFP positiva em MSCs<sup>BMP-9</sup> por microscopia de fluorescência. **D)** Expressão gênica de *Bmp-9* aos 3 dias de cultura em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20%. **D)** Expressão proteica de BMP-9 no CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> após cultura em 1, 2, 4, 8 e 24 horas sem a presença do soro fetal bovino. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) ..... 33
- Figura 2:** **Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a migração e viabilidade de MSCs primárias.** **A)** Representação visual da migração celular por microscopia de luz. **B)** Análise da migração celular em 6, 24, 48, 72 e 96 horas na presença do meio condicionante. **C)** Análise da viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas na presença do meio condicionante. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: **A** = 200  $\mu$ m ..... 34
- Figura 3:** **Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs primárias.** **A)** Expressão gênica de *Runx2*. **B)** Expressão proteica de RUNX2. **C)** Expressão gênica de *Alp*. **D)** Expressão proteica de ALP. **E)** Atividade de ALP *in situ*. **F)** Expressão gênica de *Opn*. **G)** Expressão proteica de OPN. As expressões gênicas foram avaliadas aos 5 e 7 dias e a expressão proteica e atividade de ALP *in situ*, aos 10 dias de cultura. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) ..... 35
- Figura 4:** **Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.** **A)** Reconstrução 3D de defeitos de calvária sem tratamento. **B)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup>. **C)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. **D)** Parâmetro morfométrico de volume ósseo (BV). **E)** Porcentagem de volume ósseo (BV/TV). **F)** Superfície óssea (BS). **G)** Espessura trabecular (Tb.Th). **H)** Número de trabéculas (Tb.N). **I)** Separação trabecular (Tb.S). Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: **A-C** = 1mm. **J e M)** Imagens histológicas de microscopia de luz dos defeitos sem tratamento. **K e N)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup>. **L e O)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. As micrografias de maior aumento representadas nas imagens **M-O**

correspondem as regiões definidas pelos quadrados com bordas contínuas nas imagens **J-L**. O inset presente na imagem **O** representa o quadrado com bordas tracejadas na figura **L**. Barra de escala: **J-L**: 2,25 mm; **M-O**: 100  $\mu\text{m}$ ; **O (inset)**: 50  $\mu\text{m}$ . Representação: **ct**: tecido conjuntivo, **ob**: osteoblasto, **ot**: osteócito, **cl**: linha cimentante, **lb**: osso lamelar, **ib**: osso imaturo e **bv**: vaso sanguíneo ..... 37

**Figura 5: Efeito de MSCs<sup>BMP-9</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.** **A)** Reconstrução 3D de defeitos de calvária tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup>. **B)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. **C)** Parâmetro morfométrico de volume ósseo (BV). **D)** Porcentagem de volume ósseo (BV/TV). **E)** Superfície óssea (BS). **F)** Espessura trabecular (Tb.Th). **G)** Número de trabéculas (Tb.N). **H)** Separação trabecular (Tb.S). Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: **A-C** = 1mm. **I e K)** Imagens histológicas de microscopia de luz dos defeitos tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup>. **J e L)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. As micrografias de maior aumento representadas nas imagens **K-L** correspondem as regiões definidas pelos quadrados com bordas contínuas nas imagens **I-J**. O inset presente nas imagens **K-L** representa os quadrados com bordas tracejadas nas figuras **I-J**. Barra de escala: **I-J**: 2,25 mm; **K-L**: 100  $\mu\text{m}$ ; **K-L (inset)**: 50  $\mu\text{m}$ . Representação: **ob**: osteoblasto, **ot**: osteócito, **cl**: linha cimentante, **lb**: osso lamelar e **bv**: vaso sanguíneo ..... 38

**Figura 6: Citometria de fluxo.** Confirmação da presença do RNA guia em MSCs<sup>VPR</sup> (tubo 001, passagem 16) e MSCs<sup>BMP-9</sup> (tubo002, passagem 16) aos 3 dias de cultura em meio de crescimento não indutor MEM 20% por meio da análise de marcação GFP positivo .. 50

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes de interesse ..... | <b>24</b> |
|--|-----------|



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | <b>22</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....  | 22        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 22        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | <b>22</b> |
| 3.1 CULTURA DE CÉLULAS E CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SUPEREXPRESSÃO DE BMP-9 .....   | 22        |
| 3.1.1 Obtenção e cultura de MSCs não editadas geneticamente .....   | 22        |
| 3.1.2 Obtenção de MSCs editadas geneticamente pela técnica de CRISPR-Cas9 .....   | 23        |
| 3.1.3 Análise da expressão gênica de <i>Bmp-9</i> em MSCs <sup>VPR</sup> e MSCs <sup>BMP-9</sup> .....                                    | 24        |
| 3.2 OBTENÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS POR MSCs <sup>VPR</sup> E MSCs <sup>BMP-9</sup> E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BMP-9 SECRETADA .....    | 25        |
| 3.2.1 Análise da expressão proteica de BMP-9 em CM-MSCs <sup>VPR</sup> e CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> .....                                   | 25        |
| 3.3 EFEITO DE CM-MSCs <sup>VPR</sup> E CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> SOBRE MSCs .....  | 26        |
| 3.3.1 Migração celular .....  | 26        |
| 3.3.2 Viabilidade celular .....   | 27        |
| 3.3.3 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos .....  | 27        |
| 3.3.4 Expressão proteica de marcadores ósseos .....   | 28        |
| 3.3.5 Atividade de ALP <i>in situ</i> .....   | 29        |
| 3.4 EFEITO DE CM-MSCs <sup>VPR</sup> , CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> E MSCs <sup>BMP-9</sup> SOBRE O REPARO ÓSSEO .....                        | 29        |
| 3.4.1 Procedimento cirúrgico para criação dos defeitos de calvárias de camundongos ...  | 29        |
| 3.4.2 Tratamento dos defeitos ósseos pela injeção de CM-MSCs <sup>VPR</sup> e CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> ....                               | 30        |
| 3.4.3 Tratamento dos defeitos ósseos pela injeção de MSCs <sup>BMP-9</sup> .....  | 31        |
| 3.4.4 Análise $\mu$ CT .....  | 31        |
| 3.4.5 Análise histológica .....   | 31        |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 32        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>32</b> |
| 4.1 Eficiência da superexpressão de <i>Bmp-9</i> e detecção de BMP-9 no meio condicionado .....   | 32        |
| 4.2 Efeito de CM-MSCs <sup>VPR</sup> e CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> sobre a migração e viabilidade celular ....                               | 33        |
| 4.3 Efeito de CM-MSCs <sup>VPR</sup> e CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica .....                                 | 34        |
| 4.4 Efeito de CM-MSCs <sup>VPR</sup> e CM-MSCs <sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongo ..... | 35        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.5 Efeito de MSCs<sup>BMP-9</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongo .....</b> | <b>38</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>APÊNDICE I .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>ANEXO I .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>ANEXO II .....</b>   | <b>52</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, estima-se uma elevação do número de intercorrências que comprometem o tecido ósseo. Doenças como artrite e câncer, além de traumas, podem gerar defeitos no esqueleto, exigindo procedimentos cirúrgicos para o reparo e/ou substituição do tecido lesionado (BIANCO et al., 2008; BRYDONE et al., 2010; WALMSLEY et al., 2016). Sabe-se que o tecido ósseo apresenta grande capacidade de regeneração quando danificado; no entanto, esta capacidade é prejudicada ou perdida, dependendo das dimensões do defeito ósseo e/ou da presença de doenças sistêmicas, como a osteoporose e a osteoartrite (WALMSLEY et al., 2016).

Levantamentos recentes mostram que o mercado global de implantes ortopédicos foi avaliado em mais de 47 milhões de dólares no ano de 2022. Estima-se que esse mercado chegará a mais de 73 milhões no ano de 2032, devido aos avanços tecnológicos que buscam tratamentos mais eficazes, além do aumento da população geriátrica que é propensa a desenvolver as maiores porcentagens dos problemas ortopédicos (SWAPNA; ONKAR, 2023). Até o presente momento, os tratamentos disponíveis para essas situações, como autoenxertos, aloenxertos ou enxertos ósseos sintéticos, têm disponibilidade limitada, provocam efeitos adversos ou apresentam baixa eficiência e, por isso, novas estratégias para o tratamento de defeitos ósseos têm sido investigadas pela comunidade científica. Considerando esse contexto, as estratégias de engenharia de tecidos e terapia celular utilizam biomateriais e células para induzir o reparo ósseo e, dentre essas últimas, as células-tronco mesenquimais (MSCs) têm sido as mais estudadas (BELOTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015; FERRAZ et al. al., 2017; FREITAS et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019; FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b; FREITAS et al., 2021; ADOLPHO et al., 2022; TOTOLI et al., 2023).

As MSCs multipotentes obtidas de roedores adultos têm sido empregadas em modelos de reparo de tecidos bem estabelecidos na literatura; no entanto; sua disponibilidade e plasticidade também são limitadas (LESSA et al., 2012). Presentes em tecidos como a medula óssea, tecido adiposo, polpa dental, dentre outros, essas células possuem propriedades imunomoduladoras induzidas por citocinas inflamatórias no microambiente tecidual, além da liberação de diversas moléculas (TRAPANI et al., 2016; MERIMI et al., 2021). Estudos mostram que células injetadas em defeitos são tecido-dependentes, apresentando ação parácrina frente ao processo de regeneração tecidual (BLABER et al., 2012). Por liberarem diversos fatores tróficos, citocinas e fatores antioxidantes por meio de seu secretoma, as MSCs são capazes de modular a resposta imune e anti-inflamatória e contribuir para a regeneração do tecido ósseo (IONESCU et al., 2012; YANG et al., 2013; GUGLIANDOLO et al., 2021).

O secretoma celular é definido como um conjunto específico de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, proteínas e vesículas extracelulares, o qual, secretado no espaço extracelular, permite a comunicação celular e pode ser regulado pelas condições fisiológicas locais (BEER et al., 2017; VIZOSO et al., 2017; HAMLET et al., 2019; BERGER et al., 2021). Podendo ser encontrado no meio condicionado por células (CM), recentemente, pesquisadores têm investigado o uso do secretoma de MSCs por meio de injeções locais como uma estratégia terapêutica eficaz no campo da medicina regenerativa, técnica totalmente livre de células (MAGUIRE et al., 2013; OSUGI et al., 2012). O uso do secretoma oferece diversas vantagens, dentre elas destaca-se a segurança e o controle de aplicação terapêutica, armazenamento sem a necessidade de criopreservantes que podem ser citotóxicos, produção em massa sob condições controladas pelo laboratório produtor. Além disso, o secretoma pode ser facilmente modificado para efeitos terapêuticos específicos e desejáveis com o auxílio de ferramentas de edição gênica que permitem modular a expressão de moléculas de interesse (FAMIAN; SAHEB; MONTASERI, 2017; BAR; LIS-NAWARA; GRELEWSKI, 2021; GUGLIANDOLO et al., 2021). Vários estudos mostraram efeitos positivos do secretoma, como no reparo de tecido cardíaco danificado (MIROTSOU et al., 2011; TIMMERS et al., 2011), na melhora da função renal frente a doença renal crônica (VAN KOPPEN et al., 2012) e até mesmo na cicatrização de feridas de tecidos moles (CHEN et al., 2008; WALTER et al., 2010). Além disso, foram demonstrados efeitos positivos do secretoma de MSCs derivadas da medula óssea ou tecido adiposo no reparo do tecido ósseo (LINERO; CHAPARRO, 2014; OSUGI et al., 2012; CHANG et al., 2015; TSUCHIYA et al., 2015).

Fraturas e defeitos ósseos de tamanho crítico, mesmo em condições saudáveis, possuem limitação em seu processo de reparo, com vascularização reduzida ou interrompida, além de número insuficiente de células progenitoras (HOLMES, 2017). Os mecanismos envolvidos no reparo ósseo são complexos e envolvem uma etapa inflamatória inicial, seguida da formação de um hematoma, recrutamento de células progenitoras, formação do calo intermediário, maturação do calo e a remodelação final do calo para formação de um tecido ósseo bem arquitetado e com alta qualidade (HO-SHUI-LING et al., 2018). Dentre essas diferentes fases, sabe-se que a secreção de mediadores, dentre eles o fator de crescimento transformante beta – TGF- $\beta$  e as proteínas morfogenéticas ósseas – BMPs, são essenciais para o equilíbrio da resposta inflamatória além do recrutamento de células osteoprogenitoras que atuarão na cascata de reparo do tecido ósseo, sendo as BMPs uma das mais importantes no que tange ao estímulo à diferenciação celular (GERSTENFELD et al., 2003; YU et al., 2010; RAGATT et al., 2014; SCHLUNDT et al., 2018).

Sabe-se que as BMPs estão presentes em ossos originários dos dois tipos de ossificação, tanto endocondral quanto intramembranosa, e que estas biomoléculas agem em células ósseas por meio de duas vias de sinalização: a via canônica *Smad*-dependente e a via dependente da proteína quinase ativada por mitogênicos – MAPK (ZHANG; LI, 2005; HERPIN; CUNNINGHAM, 2007; LAMPLOT et al., 2013). Com relação às moléculas sinalizadoras que atuam no processo de reparo do tecido ósseo, a proteína morfogenética óssea 9 (BMP-9), apesar de ainda pouco explorada, é considerada uma das mais osteogênicas, com ampla ação proliferativa e anti-apoptótica (HERRERA et al., 2013; WANG et al., 2013; FREITAS et al., 2021). Apesar de ser uma proteína pouco expressa em indivíduos adultos, pode ser expressas em hepatócitos e secretadas na circulação. Até o momento, os fatores e detalhes que regulam a estabilidade e a atividade biológica da BMP-9 e maior potencial osteogênico frente a outras BMPs ainda são desconhecidos (LUO et al., 2010; BIDART et al., 2012). Estudos utilizando fibroblastos embrionários e células das linhagens C2C12 e C3H10T1/2, demonstraram que a BMP-9 é mais resistente à ação inibitória do antagonista extracelular *Noggin*, o que poderia explicar seu maior efeito osseoindutor quando comparada a outras BMPs, como a BMP-2, -4, -6 e -7 (CHENG et al., 2003; WANG et al., 2013; LIAO et al., 2017; BHARADWAZ; JAYASURIYA, 2021).

Como membro da superfamília de TGF- $\beta$ , a BMP-9 é um homodímero que forma um complexo de sinalização com dois receptores do tipo I e dois do tipo II, cuja sinalização se dá por meio da atividade direta com o receptor quinase 1 semelhante ao receptor de ativina de alta afinidade (ALK1), o receptor ALK2 e altas concentrações de BMP-9 circulante (DAVID et al., 2008; LUO et al., 2010; WEI et al., 2014). Foi demonstrado que osteoblastos crescidos em superfície nanotopográfica de titânio são mais responsáveis pelo efeito osteogênico da BMP-9 (SOUZA et al., 2018). Além disso, dados publicados recentemente pelo nosso grupo mostram que MSCs editadas geneticamente e que superexpressam a BMP-9 (MSCs<sup>BMP-9</sup>) induzem aproximadamente 2 vezes mais reparo ósseo do que as MSCs de controle (FREITAS et al., 2021).

Considerando que o secretoma de MSCs cultivadas é acumulado no CM e os efeitos positivos de MSCs<sup>BMP-9</sup> no reparo ósseo, nossa hipótese é que o secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> aumenta a diferenciação osteoblástica de MSCs e a formação óssea de defeitos na calvária de camundongos (CHENG et al., 2003; FREITAS et al., 2021). Para testar nossa hipótese, MSCs serão cultivadas em condições indutoras de não diferenciação na presença de CM de MSCs<sup>BMP-9</sup> (CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>) e a migração celular, viabilidade e diferenciação osteoblástica serão

avaliadas. Além disso, o CM- $MSCs^{BMP-9}$  será injetado diretamente em defeitos da calvária de camundongos e a formação óssea será avaliada.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial do secretoma presente no meio condicionado por MSCs editadas geneticamente por CRISPR-Cas9 para superexpressão de BMP-9 ( $MSCs^{BMP-9}$ ) na indução da diferenciação osteoblástica de MSCs e no reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar a presença de BMP-9 no meio condicionado por  $MSCs^{BMP-9}$ ;
- Avaliar o efeito do secretoma presente no meio condicionado por  $MSCs^{BMP-9}$  sobre migração, viabilidade e diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas da medula óssea de camundongos;
- Avaliar o efeito do secretoma presente no meio condicionado por  $MSCs^{BMP-9}$  sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.
- Comparar o efeito da injeção do secretoma presente no meio condicionado por  $MSCs^{BMP-9}$  com a injeção direta de  $MSCs^{BMP-9}$  sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP, sobre ofício CEUA n° 45/2020 – processo n° 2020.1.219.58.6 (ANEXO D).

### **3.1 CULTURA DE CÉLULAS E CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SUPEREXPRESSÃO DE BMP-9**

#### **3.1.1 Obtenção e cultura de MSCs não editadas geneticamente**

MSCs primárias foram isoladas da medula óssea de fêmures de 16 camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de vida, com aproximadamente 35 g de peso corporal. Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de Cloridrato de Xilazina (Agribrands, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina (Agribrands), na dosagem de 15 mg/kg e 75 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal, seguido de exposição ao CO<sub>2</sub> em

fluxo de 100% e ordem de 20% do volume da câmara. Após a confirmação da eutanásia, os fêmures foram removidos e transportados em tubos eppendorf contendo solução salina tamponada com fosfato – PBS (Gibco-Life Technologies, Massachusetts, EUA), sobre o gelo. No fluxo laminar, o conteúdo biológico foi transferido para uma placa de petri, ainda no gelo, para remoção das epífises. Após remoção das epífises, as diáfises foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL (2 diáfises / tubo) e o conjunto foi centrifugado a 5000 rpm por 3 minutos para extração do conteúdo celular de interesse. Após centrifugação, as diáfises foram descartadas e o conteúdo celular obtido em cada tubo foi suspenso em 1 mL de tampão de lise Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche, São Paulo, Brasil), que estava armazenado a 4°C, por 2 minutos em temperatura ambiente. Passado esse tempo, os agregados celulares foram transferidos para um único tubo falcon contendo PBS e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Finalizado esse passo, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20%, o qual continha meio essencial mínimo modificação alfa –  $\alpha$ -MEM (Gibco-Life Technologies) suplementado com 20% de soro fetal bovino – SFB (Gibco-Life Technologies) e 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco-Life Technologies). A ressuspensão foi dividida em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) que continham o mesmo meio de crescimento e as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico até atingirem 70% de confluência. As trocas do meio de cultura foram a cada 48 horas.

### **3.1.2 Obtenção de MSCs editadas geneticamente pela técnica de CRISPR-Cas9**

MSCs<sup>BMP-9</sup> foram obtidas previamente por pesquisadores do nosso grupo, as quais foram editadas geneticamente por meio da técnica Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9) conforme descrito por Freitas et al. (2022). Brevemente, MSCs foram imortalizadas, expandidas e cultivadas em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20% até atingirem 70% de confluência. Após 24 horas do plaqueamento, em uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated), essas células foram infectadas com plasmídeos que codificavam um RNA guia customizado para BMP-9 com repórter Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP), juntamente com plasmídeo Lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro (#99373, Addgene, Massachusetts, EUA) contendo ativadores transcricionais responsáveis pela superexpressão do gene alvo. Como controle, foram utilizadas MSCs transfectadas apenas com o plasmídeo Lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro citado anteriormente (MSCs<sup>VPR</sup>).

### 3.1.3 Análise da expressão gênica de *Bmp-9* em MSCs<sup>VPR</sup> e MSCs<sup>BMP-9</sup>

Aos 3 dias de cultura foi avaliada a expressão gênica de *Bmp-9* pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real – RT-PCR. Para isso, células MSCs<sup>VPR</sup> e MSCs<sup>BMP-9</sup> (passagem 16) foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated), numa densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20%, conforme descrito em seções anteriores. As células foram lisadas e o material genético isolado por meio do reagente Trizol (Invitrogen, Massachusetts, EUA). A extração do RNA total se deu por meio do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Wisconsin, EUA) e sua integridade foi determinada por eletroforese microfluídica no aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) conforme recomendações do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total no aparelho Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems para RT-PCR (Invitrogen). As reações para a quantificação da expressão gênica foram realizadas utilizando o sistema de sondas SYBR® (Invitrogen) no aparelho StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e as reações foram realizadas em triplicata (n = 3), com volume de 7 µL de SYBR® Green PCR Master Mix, 0,5 µL de cada primer (forward – F e reverse – R) e 5 µL de cDNA (12,5 ng). A reação de amplificação ocorreu em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação usada para análise da especificidade de amplificação. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene Fator de Iniciação de Tradução Eucariótica 2β (*Eif2β*), o qual foi estabelecido para a normalização dos níveis de expressão do gene avaliado. Os resultados obtidos para o gene *Bmp-9* foram analisados com base na média do valor de  $\Delta C_t$  (limiar do ciclo delta) e expressos em unidades de expressão relativa – REU, conforme cálculo descrito:  $REU = 10,0000/2^{\Delta C_t}$  (ALBESIANO et al., 2003). Os primers foram desenhados utilizando o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA), considerando uma eficiência entre 95 e 100% (Tabela 1).

**Tabela 1:** Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de genes de interesse

| Gene         | Primers sense (F) e anti-sense (R)<br>(Sequência 5' → 3') | Pares de Base |
|--------------|---|---------------|
| <i>Eif2β</i> | ACCTCCCTGGAATACTCTGACT<br>TCGCCCCGTCTTTGATGAAT            | 136           |



|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| <i>Bmp-9</i> | CAGAACTGGGAACAAGCATC<br>GCCGCTGAGGTTTAGGCTG     | 64  |
| <i>Runx2</i> | CTTCACAAATCCTCCCCAAGTG<br>GGAATGCGCCCTAAATCACTG | 150 |
| <i>Alp</i>   | GGGGTACAAGGCTAGATGGC<br>CGGGCTCAAAGAGACCTAAGA   | 150 |
| <i>Opn</i>   | CGACCATGAGATTGGCAGTGA<br>GGCTGTAAAGCTTCTTCTCTCT | 108 |

### 3.2 OBTENÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS POR MSCs<sup>VPR</sup> E MSCs<sup>BMP-9</sup> E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BMP-9 SECRETADA

Os meios condicionados por MSCs<sup>VPR</sup> (CM-MSCs<sup>VPR</sup>) e MSCs<sup>BMP-9</sup> (CM-MSCs<sup>BMP9</sup>) foram obtidos como previamente descrito por Chang et al. (2015). Após a confluência de 70%, as garrafas foram lavadas três vezes com PBS e um novo meio constituído por  $\alpha$ -MEM suplementado com 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco-Life Technologies) foi adicionado, sem a presença do SFB. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Ao final de 1, 2, 4, 8 e 24 horas, os meios condicionados foram coletados, centrifugados a 2000 rpm a 4°C por 5 minutos, armazenados em tubos falcon de 50 mL e estocados a -80°C até o momento de seu uso.

#### 3.2.1 Análise da expressão proteica de BMP-9 em CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>

Após a coleta de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSC<sup>BMP-9</sup> em 1, 2, 4, 8 e 24 horas, foi avaliada a expressão proteica de BMP-9 por meio do teste de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para isso, foi utilizado o Mouse BMP-9 ELISA kit (#ab267576, Abcam, Cambridge, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Após descongelados 10 mL de cada amostra em temperatura ambiente, as mesmas foram concentradas 75 vezes em tubos Vivaspin® MWCO Polyethersulfone (Sigma Aldrich, Missouri, EUA), em centrífuga do tipo basculante, a 3000 g e 4°C. Após concentração dos meios condicionados e preparo dos reagentes, a placa do kit que empregava o anticorpo específico para BMP-9 foi incubada com 100  $\mu$ L de solução assay diluent e 50  $\mu$ L das proteínas padrão, controle e amostras, durante 2,5 horas em agitador orbital e temperatura ambiente. Feito isso, o conteúdo foi descartado e a placa lavada com 300  $\mu$ L de wash solution, além de incubada com 100  $\mu$ L de anticorpo primário biotinelado anti-BMP9 durante 1 hora e depois com 100  $\mu$ L de anticorpo secundário marcado com a enzima horseradish peroxidase (Estreptavidina conjugada – HRP) durante 45 minutos. Após este período, adicionou-se 100  $\mu$ L de substrato (TMB - 3,3',5,5' tetramethyl benzidine e peróxido de

hidrogênio), sendo dessa vez a placa incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com a adição de 50 µL de stop solution (ácido sulfúrico 1 N). A leitura da absorbância foi feita no aparelho *PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer* (BioTek Instruments, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 450 nm, sendo as concentrações da proteína BMP-9 calculadas em pg/mL (n = 3). Para a realização da próxima etapa do estudo, descrita no item 3.3, foi utilizado o meio condicionado coletado no período que houve o maior pico de expressão proteica de BMP-9 secretada.

### 3.3 EFEITO DE CM-MSCs<sup>VPR</sup> E CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> SOBRE MSCs

As MSCs derivadas de medula óssea foram obtidas como descrito no item 3.1.1 e cultivadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated) e  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated). Todas as MSCs primárias foram crescidas em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20%, sendo as trocas de meio realizadas a cada 48 horas. Essas células foram cultivadas por períodos de até 10 dias e os experimentos foram realizados em duplicata biológica. Para avaliação do efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs primárias, foram adicionados os meios condicionados numa proporção 1:1 de volume com o meio de crescimento fresco sempre nas últimas 48 horas que antecediam o experimento a ser realizado, o qual foi denominado de meio de condicionamento (CMM). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

#### 3.3.1 Migração celular

Em 6, 24, 48, 72 e 96 horas de cultura foi avaliada a capacidade de migração celular pelo método de scratch, como descrito previamente por Liang et al. (2007). Para isso, as MSCs primárias foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated) com meio MEM 20% até atingirem 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 100 µL e de uma régua esterilizada, foi realizado um risco no centro de cada poço. Posteriormente, os poços foram lavados com solução de PBS (Gibco-Life Technologies) para remoção dos fragmentos celulares destacados e, posteriormente, foram adicionados 2 mL/poço de CMM que foi trocado a cada 48 horas. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Para obtenção das imagens, foram demarcados pontos de referência no fundo de cada placa para permitir a obtenção de fotomicrografias sempre das mesmas regiões do risco nos diferentes períodos de avaliação. As

imagens foram adquiridas com câmera digital Nikon DS-Fi1c (Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de fase invertido Nikon Eclipse Ti-S (Nikon Instruments Inc.), sendo a área sem células demarcada e mensurada pelo software Nis Elements Br 5.02 (Nikon Instruments Inc.). Os dados foram obtidos em quintuplicata ( $n = 5$ ) e convertidos de  $\mu\text{m}^2$  para porcentagem (%) de área fechada, sendo feita a análise da área sob a curva.

### 3.3.2 Viabilidade celular

Em 24, 48 e 72 horas de cultura foi avaliada a viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]. Para isso, as MSCs primárias foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated) com CMM desde o período de plaqueamento, sendo o mesmo trocado em 48 horas. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Durante os períodos de avaliação, os CMMs foram removidos, os poços lavados com solução de PBS (Gibco-Life Technologies), preenchidos com 1 mL de solução de MTT 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C por 4 horas. A seguir, os sobrenadantes foram removidos e os cristais foram solubilizados com um volume de 150  $\mu\text{L}$  de solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas suavemente por 5 minutos e os 150  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning Incorporated). A absorbância foi avaliada no aparelho BioTek Epoch 2 Microplate Reader (Agilent Technologies) num comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata ( $n = 5$ ) e expressos por absorbância.

### 3.3.3 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos

Aos 5 e 7 dias de cultura foi avaliada a expressão gênica do Fator de transcrição 2 relacionado à *Runt* (*Runx2*), Fosfatase alcalina (*Alp*) e Osteopontina (*Opn*) por RT-PCR, conforme descrito no item 3.1.3. Para isso, MSCs primárias foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated), numa densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço, em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20% e, tanto no terceiro quanto quinto dia, o meio foi removido e substituído por CMM que permaneceu até o quinto e sétimo dia de cultura, respectivamente. As reações foram realizadas em triplicata ( $n = 3$ ) e, como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene *Eif2 $\beta$* , o qual foi estabelecido para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados (Tabela 1). O método comparativo de  $2^{-\text{ddCt}}$  foi utilizado para comparação das expressões gênicas das células dos diferentes grupos experimentais (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

### 3.3.4 Expressão proteica de marcadores ósseos

Aos 10 dias, foi avaliada a expressão das proteínas RUNX2 (55-62 kDa), ALP (75-80 kDa) e OPN (41-75 kDa) pela técnica de western blot. Para isso, MSCs primárias foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated), numa densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço), em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20% e, no oitavo dia, o meio foi removido e substituído por CMM que permaneceu até o décimo dia. As células foram coletadas e lisadas com 200  $\mu$ L de solução Pierce<sup>TM</sup> RIPA Buffer (Thermo Scientific), sonicadas no aparelho QSonica Microson XL-2000 (Misonix Sonicators, Nova Iorque, EUA) e centrifugadas por 20 minutos a 13000 rpm e 4°C. Após este passo, o sobrenadante foi coletado e a proteína total foi quantificada no aparelho PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer (Biotek) em comprimento de onda de 750 nm, baseada na curva padrão de BSA 1,5 mg/mL (método de Lowry). Géis de acrilamida de 8% foram confeccionados e montados em aparados Mini-PROTEANR® Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) específicos para sistema vertical de eletroforese, os quais foram preenchidos com tampão de corrida previamente preparados. No primeiro poço do gel foi adicionado 10  $\mu$ L do marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color Standart (Bio-Rad Laboratories) que identifica bandas entre 10 a 250 kDa, além de 30  $\mu$ g de proteína + marcador Dye (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) nos poços seguintes – 35  $\mu$ L de volume final em cada poço. Após corrida de eletroforese no aparelho PowerPac<sup>TM</sup> HC (Bio-Rad Laboratories), as proteínas foram transferidas dos géis de acrilamida para membrana de Fluoreto de Polivinilideno Trans-Blot® Turbo Mini Format 0,2  $\mu$ m PVDF (Bio-Rad Laboratories) por meio de transferência semiúmida no Trans-Blot® Turbo<sup>TM</sup> Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Após lavagem da membrana com tampão salino TBS-T 1X (Sigma-Aldrich), as membranas foram incubadas por 1 hora em solução de bloqueio de sítios inespecíficos, a qual era composta por 5% de Blotting Grade Blocker – Dry Milk (Bio-Rad Laboratories) dissolvido em TBS-T 1X. Após o bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários anti-RUNX2 (#8486S, monoclonal rabbit, 1:1000, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EUA), anti-ALP (#ab108337, monoclonal rabbit, 1:15000, Abcam), anti-OPN (#MPIIB10-1, monoclonal mouse, 1:1000, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, EUA) e anti-GAPDH (#sc-25778, polyclonal rabbit, 1:3000, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com solução de TBS-T 1X por 5 minutos cada e incubadas com os anticorpos secundários conjugados apropriados, sendo o anti-rabbit (#7074S, anti-rabbit IgG-HRP, 1:3000, Cell Signaling Technology) e o anti-mouse (#sc-2060, goat anti-mouse IgG<sub>1</sub>-

HRP, 1:3000, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora à temperatura ambiente. Para a imunodeteção, foi utilizado o reagente Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) e o sistema de aquisição de imagem G-Box gel (Syngene, Califórnia, EUA). Foi considerada a marcação de GAPDH como proteína constitutiva, a qual foi marcada sempre após a detecção da proteína óssea de interesse (1 proteína por membrana), processo que aconteceu depois da limpeza da membrana já revelada com a solução Re-Blot Plus Strong 10X (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 40 minutos à temperatura ambiente, seguido da repetição de todos os passos citados anteriormente para marcação de uma nova proteína. As imagens capturadas foram analisadas com o software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health, Canadá, EUA). Os dados foram obtidos em triplicata ( $n = 3$ ), normalizados por GAPDH e demonstrados graficamente por meio da expressão proteica relativa.

### **3.3.5 Atividade de ALP *in situ***

Aos 10 dias, foi avaliada a atividade de ALP *in situ* pelo método Fast Red. Para isso, MSCs primárias foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated), numa densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço, em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20% e, no oitavo dia, o meio foi removido e substituído por CMM que permaneceu até o décimo dia. O meio de cultura foi removido e os poços lavados com solução de PBS (Gibco-Life Technologies). Em seguida, foi adicionado 1 mL/poço de solução tampão Tris 120 mM / pH = 8,4 (Sigma-Aldrich), composta por uma concentração de 1,8 mM de Fast Red TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de Naftol-ASMX-Fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de Dimetilformamida (Merck). As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Em seguida, a solução foi removida e as placas ficaram em temperatura ambiente para permitir a secagem e aquisição das imagens macroscópicas dos poços contendo as culturas coradas. As imagens foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução Canon EOS Digital Rebel – 6.3 megapixels, lente macro EF100 f/2.8 (Canon, Tóquio, Japão) e mensuradas pelo software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health). Os dados foram obtidos em quintuplicata ( $n = 5$ ) e representados como porcentagem de área corada.

## **3.4 EFEITO DE CM-MSCs<sup>VPR</sup>, CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> E MSCs<sup>BMP-9</sup> SOBRE O REPARO ÓSSEO**

### **3.4.1 Procedimento cirúrgico para criação dos defeitos de calvárias de camundongos**

Quarenta e oito camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de idade, foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos de 4 mm em calvária (ZHANG et al., 2015; YE et al., 2022). Para isso, os animais foram anestesiados com

solução anestésica de Cloridrato de Xilazina (Agribrands) e Cloridrato de Cetamina (Agribrands), na dosagem de 10 mg/kg e 50 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal. Após tricotomia e antisepsia da região dorsal da cabeça com solução de iodo-povidine não alcoólico (PVPI), a pele e o tecido subcutâneo foram incisados por 1 cm ao longo da sutura sagital para exposição dos ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi descolado e o defeito produzido unilateralmente no lado esquerdo por broca trefina de diâmetro externo de 4 mm (Harte, São Paulo, Brasil) montada em contra ângulo redutor, sob irrigação abundante com soro fisiológico. Este padrão cirúrgico para criação dos defeitos foram mantidos em todos os animais de modo a evitar possíveis interferências do tratamento no lado contralateral. Após a criação do defeito, a pele foi unida e suturada com fio mononylon 4.0 (Ethicon, Nova Jersey, EUA). Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram medicados com dose de anti-inflamatório não-esteroidal Meloxicam (Merck) numa proporção de 2 mg/kg de peso corporal por via intramuscular, a cada 12 horas por 3 dias, e dose única de solução de Pentantibiótico® Veterinário Reforçado (Zoetis-Fort Dodge, Nova Jersey, EUA) numa proporção de 1 mg/kg de peso corporal por via intramuscular, sendo o pentabiótico composto por Benzilpenicilina benzatina 3.000.000 UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000 UI, Benzilpenicilina potássica 1.500.000 UI, Dihidroestreptomicina base (sulfato) 1.250 mg e Estreptomicina base (sulfato) 1.250 mg. O local do defeito foi marcado com fio de nylon 8.0 (Ethicon) para nortear o local da posterior injeção. Os animais foram mantidos em número de 3 por caixa recebendo ração e água ad libitum e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

### **3.4.2 Tratamento dos defeitos ósseos pela injeção de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>**

Uma semana após a criação dos defeitos nas calvárias, período que equivale a um ano em seres humanos (WANG et al., 2020), os animais foram sedados com anestésico inalatório Isoflurano 1% (Cristália, São Paulo, Brasil) e receberam injeções locais de CM-MSCs<sup>VPR</sup>, CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> ou não receberam nenhum tratamento (n = 12 animais por grupo). Após os meios condicionados serem descongelados em temperatura ambiente, foram concentrados 75 vezes em tubos Vivaspin® MWCO Polyethersulfone (Sigma Aldrich) e centrifugados a 3000 g e 4°C. Com a utilização de agulha 30G (BD PrecisionGlide, Nova Jersey, EUA), foi injetado subperiostealmente 25 µL do meio condicionado em cada defeito. Quatro semanas após o tratamento dos defeitos, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de Cloridrato de Xilazina (Agribrands) e Cloridrato de Cetamina (Agribrands), na dosagem de 15 mg/kg e 75 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal, seguido de exposição ao CO<sub>2</sub> em fluxo de 100%

e ordem de 20% do volume da câmara. Após a confirmação da eutanásia, as calvárias foram removidas e armazenadas em solução de formalina tamponada para posterior avaliação do tecido ósseo formado por meio das análises microtomográfica ( $\mu$ CT) e histológica.

### **3.4.3 Tratamento dos defeitos ósseos pela injeção de MSCs<sup>BMP-9</sup>**

Uma semana após a criação dos defeitos nas calvárias, animais foram tratados com  $2,5 \times 10^6$  células suspensas em 25  $\mu$ L de PBS ( $n = 7$ ) injetadas diretamente nos defeitos ósseos, conforme descrito no item 3.4.2. Quatro semanas após o tratamento, a formação óssea foi avaliada por  $\mu$ CT e análise histológica, para posterior comparação com os defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> do experimento anterior.

### **3.4.4 Análise $\mu$ CT**

Após coletadas as calotas cranianas, foi avaliado o tecido ósseo formado nos defeitos não tratados e tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> por meio da análise  $\mu$ CT. Para isso, as calvárias fixadas foram transferidas para uma solução de etanol 70%, onde permaneceram por 3 dias. Amostras de tecido ósseo da calvária, retiradas no momento da cirurgia para a criação dos defeitos, também foram processadas com o objetivo de comparar o osso formado com o tecido ósseo previamente existente na calvária. A análise foi realizada no microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA) operado com uma fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel e resolução de até 1  $\mu$ m. Posteriormente, 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 (Bruker Corporation). Após as reconstruções, analisou-se dentro da área de interesse, ou seja, dentro da região dos defeitos ósseos produzidos, os seguintes parâmetros: volume ósseo ( $\text{mm}^3$ ), volume ósseo/volume total (%), superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ), espessura trabecular (mm), número de trabéculas (1/mm) e separação trabecular (mm). Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software, foram preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research - ASBMR (DEMPSTER et al., 2013; BOUXSEIN et al., 2010).

### **3.4.5 Análise histológica**

Após a realização das análises microtomográficas, as calotas cranianas foram preparadas para obtenção de cortes descalcificados. Brevemente, as peças foram descalcificadas em solução de EDTA 10% (Gibco-Life Technologies) por 2 dias, lavadas em água corrente, desidratadas em uma sequência de álcoois 70-80-95-100% (Merck) por 90

minutos, diafanizadas em solução de Xilol (Labsynth, São Paulo, Brasil) por 90 minutos e impregnadas em banhos de parafina aquecida (Sigma-Aldrich) a 60°C por 90 minutos. Após esse processo, em temperatura ambiente, foi feita a inclusão das peças previamente impregnadas com parafina em formas/estruturas quadrangulares. Após esta montagem, nessa mesma estrutura, foi adicionada uma nova parafina que estava previamente aquecida a 60°C, para construção dos blocos de corte. Os blocos foram cortados em micrótomo Microm HM 335E (Microm Internacional, Walldorf, Alemanha) com espaçamento padronizado de 5 µm de espessura, além da montagem e coloração das lâminas histológicas (Knittel Glass, Braunschweig, Alemanha) com os corantes hematoxilina e eosina (Neon Comercial Reagentes, São Paulo, Brasil). Para a análise histológica descritiva, as imagens foram obtidas em câmera digital AxioCam ICc3 (Carl Zeiss Incorporated, Baden-Württemberg, Alemanha) acoplada a um microscópio de fluorescência DMLB (Leica, Wetzlar, Alemanha).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de variâncias para determinação da análise estatística mais adequada. Em casos de normalidade dos dados, para a análise de dados paramétricos, foi aplicado o Teste t de Student, teste de correlação de Pearson, ANOVA One-Way ou o teste ANOVA Two-Way seguido do teste de Tukey, quando necessário. Para a análise de dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. Todos os dados foram analisados no software SigmaPlot (Systat Software Inc., Califórnia, EUA) com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Para que eventuais diferenças entre os tratamentos propostos pudessem ser evidenciadas, o tamanho da amostra animal utilizada neste estudo foi baseada no cálculo amostral realizado previamente ao início do estudo por meio do software GPower version 3.0.10 (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Alemanha), com um poder de teste (power) = 95% e uma probabilidade de erro = 5%.

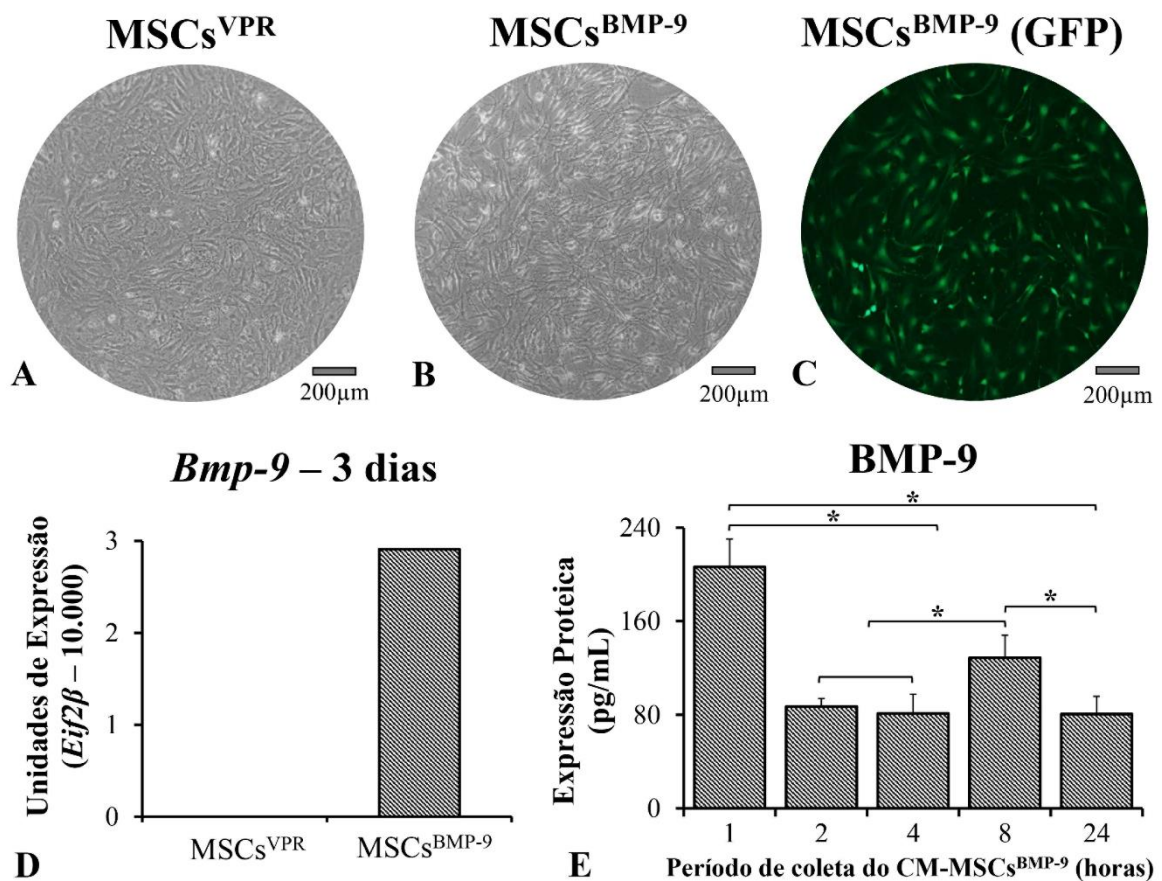
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Eficiência da superexpressão de *Bmp-9* e detecção de BMP-9 no meio condicionado

Uma vez coletados os meios condicionados, as MSCs<sup>VPR</sup> e MSCs<sup>BMP-9</sup> foram fotografadas em microscopia de luz após cultura de 1 hora sem a presença do SFB (Figura 1A e B). Após seleção com puromicina, imagens das células MSCs<sup>BMP-9</sup> foram obtidas por microscopia de fluorescência para identificação do marcador GFP presente em um dos braços do RNA guia (Figura 1C), mostrando que todas as células que foram editadas geneticamente



para a superexpressão de BMP-9 emitiam fluorescência verde, ou seja, sofreram a transfecção plasmidial desejada. Esses dados corroboraram os achados adicionais da citometria de fluxo, uma vez que as células MSCs<sup>BMP-9</sup> apresentaram 100% de marcação GFP positiva (APÊNDICE D). Além disso, aos 3 dias de cultura, foi confirmada a superexpressão de *Bmp-9* nas MSCs<sup>BMP-9</sup> em comparação às MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 1D,  $p = 0,020$ ). Quanto à expressão proteica de BMP-9 no CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, o pico de expressão seu deu após 1 hora de cultura, sendo maior comparado a todos os outros períodos avaliados ( $p < 0,001$  para todas as comparações) e maior 8 horas quando comparado a 2, 4 e 24 horas (Figura 1E,  $p < 0,001$  para todas as comparações). A expressão de BMP-9 não foi detectada no CM-MSCs<sup>VPR</sup>.

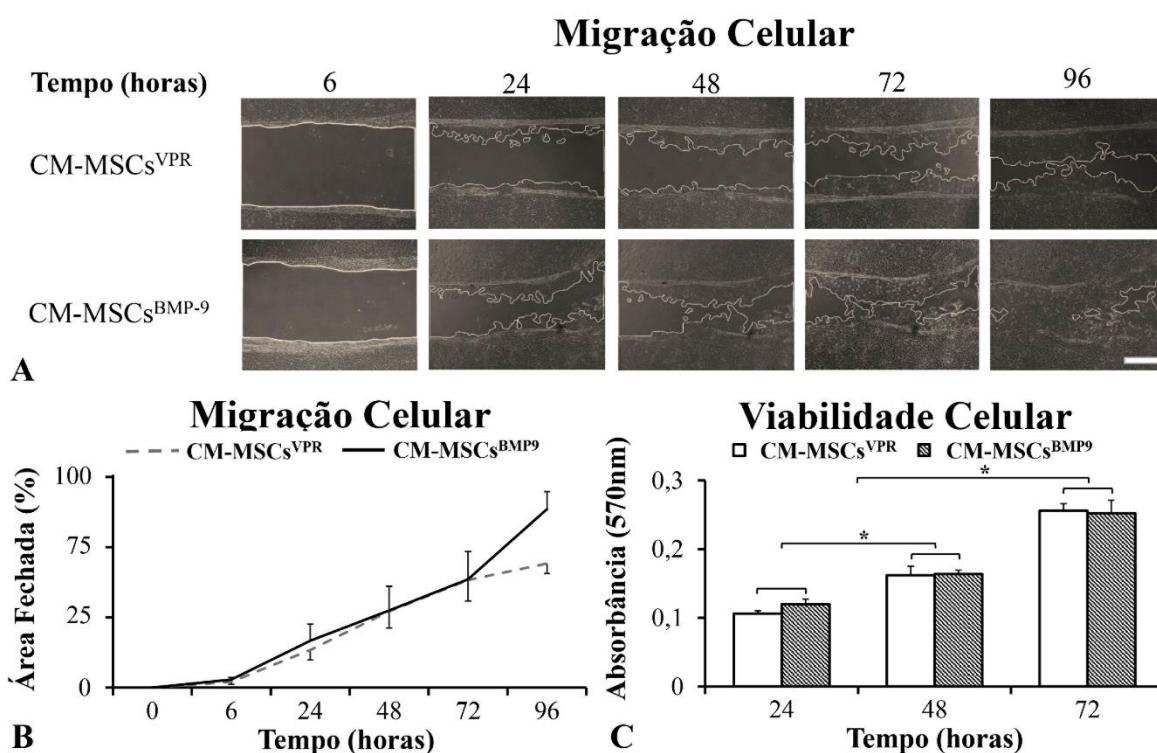


**Figura 1: Eficiência da edição gênica de MSCs imortalizadas para a superexpressão de BMP-9 e a sua presença no meio condicionado.** Imagens de microscopia de luz de A) MSCs<sup>VPR</sup> e B) MSCs<sup>BMP-9</sup> na passagem 16, após coleta do meio condicionado em 1 hora sem soro fetal bovino. C) Avaliação da marcação GFP positiva em MSCs<sup>BMP-9</sup> por microscopia de fluorescência. D) Expressão gênica de *Bmp-9* aos 3 dias de cultura em meio de crescimento não-indutor de diferenciação MEM 20%. E) Expressão proteica de BMP-9 no CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> após cultura em 1, 2, 4, 8 e 24 horas sem a presença do soro fetal bovino. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2 Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a migração e viabilidade celular

Ao final de 96 horas de cultura de MSCs em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, mesmo observando visualmente maior fechamento da área aberta (Figura 2A), não houve diferença estatisticamente significativa na migração celular quando comparadas às MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 2B,  $p = 0,287$ ).

Quanto a viabilidade celular, houve aumento progressivo de células viáveis tanto para MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> quanto em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> de 24 para 48 e de 48 para 72 horas (Figura 2C,  $p < 0,001$  para todas as comparações). Não houve diferença na viabilidade entre as MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> ou em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> em 24, 48 e 72 horas (Figura 2C,  $p = 0,065$ ,  $p = 0,818$  e  $p = 0,585$  respectivamente).



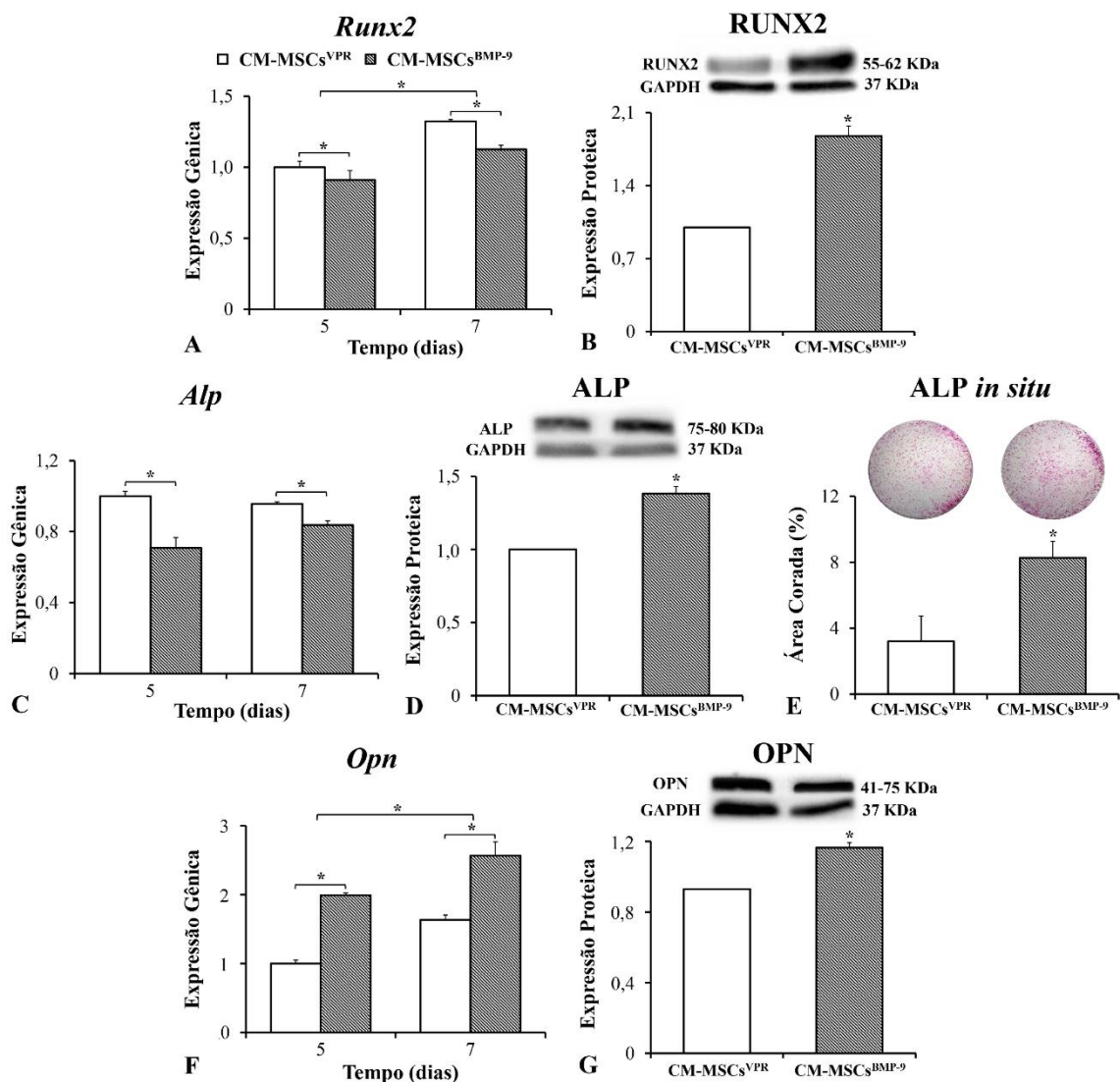
**Figura 2: Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a migração e viabilidade de MSCs primárias.** A) Representação visual da migração celular por microscopia de luz. B) Análise da migração celular em 6, 24, 48, 72 e 96 horas na presença do meio condicionante. C) Análise da viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas na presença do meio condicionante. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: A = 200  $\mu$ m.

#### 4.3 Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica

Aos 5 e 7 dias, a expressão gênica de *Runx2* foi menor em MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 3A,  $p < 0,001$  para ambos). Também, foi maior aos 7 dias comparada aos 5 dias (Figura 3A,  $p < 0,001$ ). Aos 10 dias, a expressão proteica de RUNX2 foi maior em MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 3B,  $p < 0,001$ ).

Aos 5 e 7 dias, a expressão gênica de *Alp* foi menor em MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> ( $p < 0,001$  para ambos) e não houve diferença estatisticamente significativa entre 5 e 7 dias (Figura 3C,  $p = 0,107$ ). Aos 10 dias, a expressão proteica de ALP foi maior em MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 3D,  $p = 0,005$ ), assim como a atividade de ALP *in situ* (Figura 3E,  $p < 0,001$ ).

Aos 5 e 7 dias, a expressão gênica de *Opn* foi maior em MSCs crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> ( $p < 0,001$  para ambos) e foi maior aos 7 dias comparada aos 5 dias (Figura 3F,  $p < 0,001$ ). Aos 10 dias, a expressão proteica de OPN foi maior em MSCs primárias crescidas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparadas às crescidas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 3D,  $p = 0,003$ ).

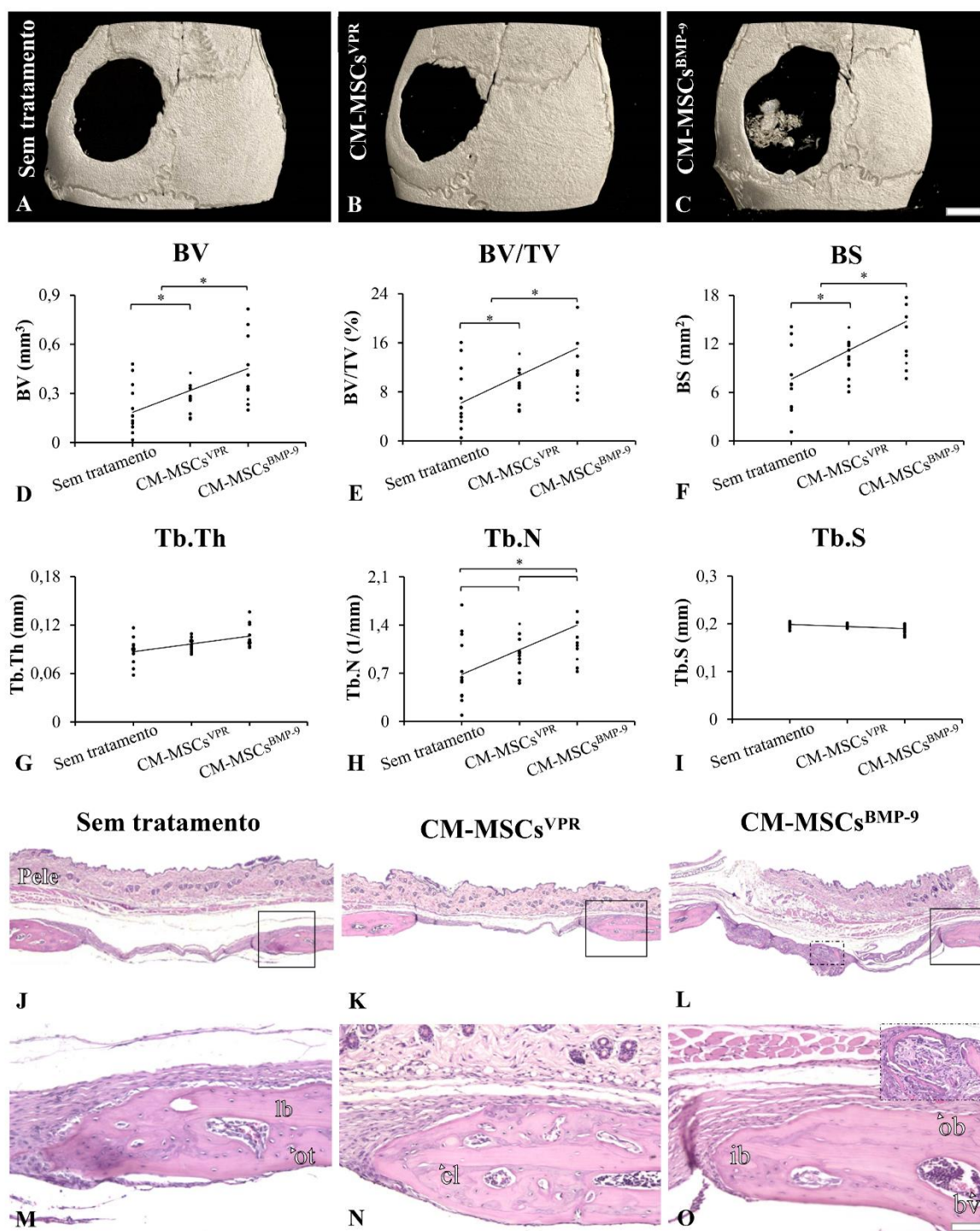


**Figura 3: Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs primárias.** A) Expressão gênica de *Runx2*. B) Expressão proteica de RUNX2. C) Expressão gênica de *Alp*. D) Expressão proteica de ALP. E) Atividade de ALP *in situ*. F) Expressão gênica de *Opn*. G) Expressão proteica de OPN. As expressões gênicas foram avaliadas aos 5 e 7 dias e a expressão proteica e atividade de ALP *in situ*, aos 10 dias de cultura. Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongo

As imagens de  $\mu$ CT reconstruídas em 3D mostraram que os defeitos tratados com a injeção de CM-MSC<sup>BMP-9</sup> exibiram maior formação óssea em comparação aos defeitos tratados com CM-MSC<sup>VPR</sup> e sem tratamento (Figura 4A-C). Os parâmetros morfométricos indicaram que BV (Figura 4D), BV/TV (Figura 4E) e BS (Figura 4F) foram maiores nos defeitos tratados com CM-MSC<sup>BMP-9</sup> ( $p = 0.014$ ,  $p = 0.014$  e  $p = 0.02$  respectivamente) comparados com defeitos sem tratamento ( $p < 0.001$  para todas as comparações) e defeitos tratados com CM-MSC<sup>VPR</sup> ( $p = 0.014$ ,  $p = 0.014$  e  $p = 0.024$  respectivamente). Foi observada uma correlação positiva entre os tratamentos e BV (Figura 4D  $r_s = 0.533$  e  $p < 0.001$ ), BV/TV (Figura 4E,  $r_s = 0.533$  e  $p < 0.001$ ) e BS (Figura 4F,  $r_s = 0.519$  e  $p = 0.001$ ). A Tb.Th não foi afetada pelos tratamentos ( $p = 0.078$ ), mas foi observada uma correlação positiva entre os tratamentos e Tb.Th (Figura 4G,  $r_s = 0.518$  e  $p = 0.001$ ). O Tb.N foi maior nos defeitos tratados CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> comparados com defeitos sem tratamento ( $p = 0.029$ ) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> ou CM-MSCs<sup>VPR</sup> ( $p < 0,050$ ) e entre defeitos sem tratamento ou tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup> (Figura 4H,  $p < 0,050$ ). Foi observada uma correlação positiva entre os tratamentos e Tb.N (Figura 4H,  $r_s = 0.503$  e  $p = 0.002$ ). A Tb.S não foi afetada pelos tratamentos ( $p = 0.067$ ), mas foi observada uma correlação negativa entre os tratamentos e Tb.S (Figura 4I,  $r_s = -0.476$  e  $p = 0.003$ ).

Os cortes histológicos mostram a presença de tecido conjuntivo, sem sinais de reações adversas, em todos os defeitos, independentemente do tratamento, além de osso formado em defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, (Figura 4A-I), corroborando com os resultados encontrados na análise morfométrica. Nas bordas de todos os defeitos, independentemente do tratamento, foi observada discreta formação óssea e presença de osso lamelar, osso imaturo, linhas cimentantes. Além disso, conforme observado nas imagens tridimensionais reconstruídas, tecido ósseo foi observado no centro dos defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, mas não nos defeitos tratados com CM-MSC<sup>VPR</sup> ou nos não tratados (Figura 4O, inset).

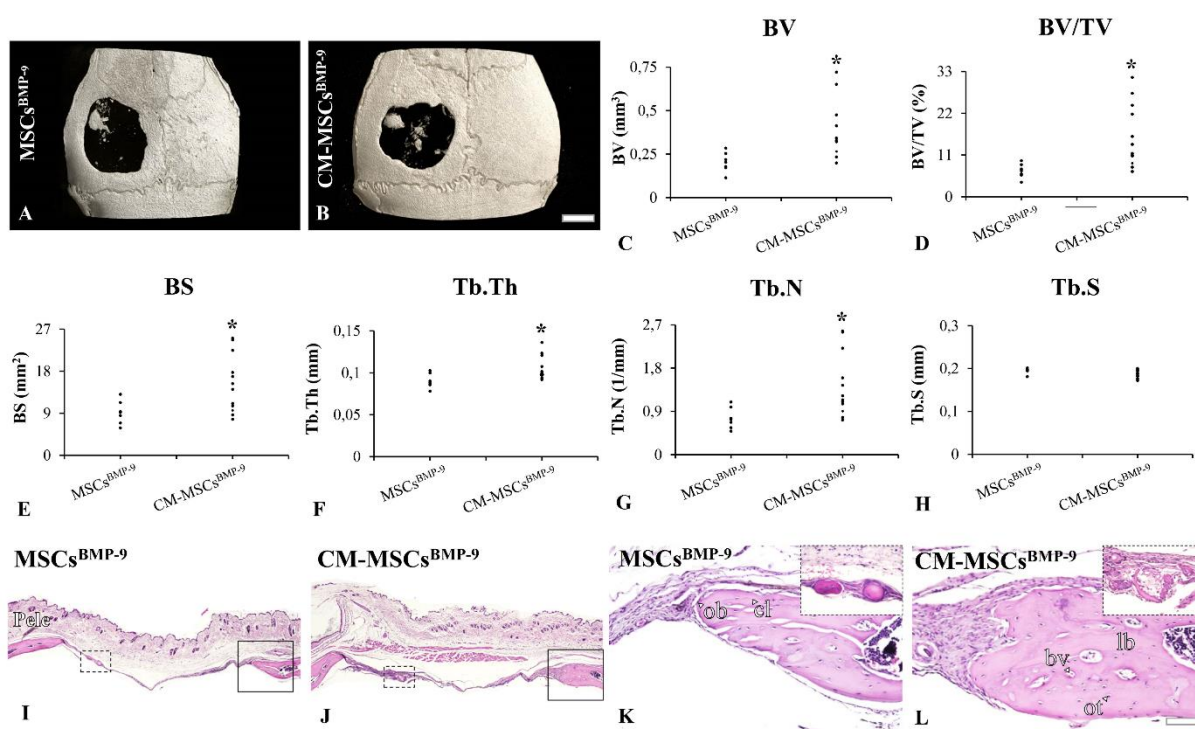


**Figura 4: Efeito de CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.** **A)** Reconstrução 3D de defeitos de calvária sem tratamento. **B)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup>. **C)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. **D)** Parâmetro morfométrico de volume ósseo (BV). **E)** Porcentagem de volume ósseo (BV/TV). **F)** Superfície óssea (BS). **G)** Espessura trabecular (Tb.Th). **H)** Número de trabéculas (Tb.N). **I)** Separação trabecular (Tb.S). Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: **A-C** = 1mm. **J e M)** Imagens histológicas de microscopia de luz dos defeitos sem tratamento. **K e N)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>VPR</sup>. **L e O)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. As micrografias de maior aumento representadas nas imagens **M-O** correspondem as regiões definidas pelos quadrados com bordas contínuas nas imagens **J-L**. O inset presente na imagem **O** representa o quadrado com bordas tracejadas na figura **L**. Barra de escala: **J-L**: 2,25 mm; **M-O**: 100 µm; **O (inset)**: 50 µm. Representação: **ct**: tecido conjuntivo, **ob**: osteoblasto, **ot**: osteócito, **cl**: linha cimentante, **lb**: osso lamelar, **ib**: osso imaturo e **bv**: vaso sanguíneo.

#### 4.5 Efeito de MSCs<sup>BMP-9</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongo

A  $\mu$ CT demonstrou que os defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> exibiram maior formação óssea em comparação a MSCs<sup>BMP-9</sup> (Figura 5A-H). As imagens tridimensionais reconstruídas mostraram tecido ósseo no centro dos defeitos tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup> ou CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> (Figura 5A-B). Os parâmetros morfométricos mostraram que BV (Figura 5C,  $p = 0,025$ ), BV/TV (Figura 5D,  $p = 0,025$ ), BS (Figura 5E,  $p = 0,044$ ), Tb.Th (Figura 5F,  $p = 0,026$ ) e Tb.N (Figura 5G,  $p = 0,034$ ) foram maiores em defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> em comparação com MSCs<sup>BMP-9</sup>. Quanto a Tb.S, foi observado que a mesma não foi afetada pelos tratamentos (Figura 5H,  $p = 0,251$ ).

Os cortes histológicos corroboraram os dados da  $\mu$ CT e seguiram o mesmo padrão descrito anteriormente (Figura 5I-L). É importante notar que a presença de tecido ósseo foi observada no centro dos defeitos tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup> ou CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> (Figura 5K-L, inset).



**Figura 5: Efeito de MSCs<sup>BMP-9</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre o reparo ósseo de defeitos criados em calvárias de camundongos.** **A)** Reconstrução 3D de defeitos de calvária tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup>. **B)** Defeitos de calvária tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. **C)** Parâmetro morfométrico de volume ósseo (BV). **D)** Porcentagem de volume ósseo (BV/TV). **E)** Superfície óssea (BS). **F)** Espessura trabecular (Tb.Th). **G)** Número de trabéculas (Tb.N). **H)** Separação trabecular (Tb.S). Dados numéricos apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Barra de escala: **A-C** = 1mm. **I e K)** Imagens histológicas de microscopia de luz dos defeitos tratados com MSCs<sup>BMP-9</sup>. **J e L)** Defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>. As microfotografias de maior aumento representadas nas imagens **K-L** correspondem as regiões definidas pelos quadrados com bordas contínuas nas imagens **I-J**. O inset presente nas imagens **K-L** representa os quadrados com

bordas tracejadas nas figuras **I-J**. Barra de escala: **I-J**: 2,25 mm; **K-L**: 100  $\mu$ m; **K-L (inset)**: 50  $\mu$ m. Representação: **ob**: osteoblasto, **ot**: osteócito, **cl**: linha cimentante, **lb**: osso lamelar e **bv**: vaso sanguíneo.

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos das BMPs em células osteoblásticas são amplamente discutidos na literatura. No entanto, a BMP-9, considerada uma das proteínas mais osteogênicas, ainda é pouco explorada (HERRERA et al., 2013; WANG et al., 2013). Por ser uma proteína secretada para o meio extracelular (WAN et al., 2014), neste estudo, avaliamos os efeitos do secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> presente no meio condicionado, sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs e o reparo de defeitos ósseos criados em calvária de camundongos. Juntos, nossos resultados mostram que a atividade osteogênica deste secretoma foi favorável tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Antes de investigar o potencial osteogênico do CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, a expressão de *Bmp-9* foi avaliada em MSCs<sup>VPR</sup> e MSCs<sup>BMP-9</sup>. Como esperado, uma quantidade significativa de expressão do gene *Bmp-9* foi detectada apenas em MSCs<sup>BMP-9</sup>, confirmando a eficiência da tecnologia CRISPR-Cas9 como ferramenta de edição gênica e corroborando nossos achados anteriores (FREITAS et al., 2021). Além disso, a presença de BMP-9 no CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> indicou que essa proteína é secretada para o meio extracelular, um achado fundamental para o progresso deste estudo (WAN et al., 2014). Vale ressaltar que a BMP-9 circulante é pouco expressa em organismos adultos, variando de 2 a 10 pg/mL, tornando a superexpressão uma abordagem interessante na investigação do seu potencial terapêutico. Além disso, mesmo em baixas concentrações, a partir de 50 pg/mL, a BMP-9 pode exercer efeitos biológicos; o que corrobora os efeitos do secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> em termos de indução da diferenciação osteoblástica e formação óssea (BIDART et al., 2012; VAN BAARDEWIJK et al., 2013; WEI et al., 2014).

Em nosso estudo, ao analisarmos a expressão proteica de BMP-9 por ELISA no meio condicionado por MSCs<sup>BMP-9</sup>, identificamos a presença dessa proteína por até 24 horas, o último período avaliado; no entanto, a quantidade máxima foi medida após a primeira hora (206 pg/mL), tornando este período o de escolha para a coleta do CM para realização dos experimentos seguintes. Os fatores que regulam a estabilidade e o ritmo de secreção da BMP-9 ainda não são claros; entretanto, sua estabilidade pode estar relacionada com a regulação do seu potencial redox, bem como pela proteólise (WEI et al., 2014). Sabe-se que os dímeros da BMP-9 podem apresentar-se de duas maneiras: uma forma D – na qual estão ligados por uma ligação covalente do tipo dissulfeto, ou na forma M – ausente de ligações covalentes (KNAUS; SEBALD, 2001). A clivagem dependente de redox do dímero da BMP-9, quando ligado de forma não covalente, pode fornecer uma via natural de degradação para esta proteína. Assim,

as frações de BMP-9 ligadas covalentemente permanecem estáveis e resistentes aos processos de proteólise (VAN BAARDEWIJK et al., 2013). As duas formas podem ser convertidas uma na outra, o que afeta diretamente o potencial redox, causando impacto direto na estabilidade e degradação de BMP-9 produzida no organismo, o que pode explicar sua baixa expressão nos indivíduos (WEI et al., 2014).

Antes de avaliarmos o potencial do meio condicionado por MSCs<sup>BMP-9</sup> no tratamento de defeitos ósseos, avaliamos seu efeito sobre a migração e viabilidade celular, além de sua capacidade frente a diferenciação osteoblástica de células MSCs obtidas da medula óssea de camundongos. Ressaltamos que utilizamos apenas o secretoma (meio condicionado), sem adição de qualquer biomaterial ou meio químico de diferenciação osteoblástica como ácido ascórbico, dexametasona e o  $\beta$ -glicerofostato associado ao meio de cultura celular (FREITAS et al., 2019; YE et al., 2022; SOUZA et al., 2023). Além disso, para avaliarmos somente os efeitos do secretoma, removemos o SFB do CM uma vez que este é comumente utilizado na suplementação de meios de cultura por serem abundante fonte de fatores de crescimento, de adesão, hormônios e lipídios (ZAKI et al., 2019).

A migração e viabilidade de MSCs cultivadas em CM-MSCs<sup>VPR</sup> e CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> aumentaram ao longo do tempo. Embora sem diferença estatisticamente significativa, foi perceptível que mais MSCs migram quando cultivadas em CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> em comparação com CM-MSCs<sup>VPR</sup> em 96 horas (média de 84% e 58% de área fechada, respectivamente) o que pode estar associado à capacidade dessas células de proliferar e migrar em resposta a estímulos específicos do seu processo de *homing* (FU et al., 2019). Esses eventos são estimulados por fatores secretados ou adicionados exogenamente, como Fator 1 derivado de células estromais (SDF-1 ou CXCL12), OPN, Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), Fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- $\beta$ , além da própria proteína BMP-9, que pode ser encontrada no meio condicionado (CHENG et al., 2003; SCHMIDT et al., 2006; BALL et al., 2007; ZOU et al., 2011; KOWALSKI et al., 2016; DUBON et al., 2018). Em conjunto, embora não quantificados, é possível que alguns desses fatores estejam aumentados no CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, uma vez que a expressão de genes relacionados à via de sinalização TGF- $\beta$ /BMP foi regulada positivamente pela superexpressão de BMP-9 (FREITAS et al., 2021).

Além disso, outra hipótese para esse achado pode estar relacionado com fatores mecânicos que regulam a proliferação e migração de MSCs, como a rigidez da matriz e a microgravidade, fatores que precisam ser ainda investigados. Quanto à rigidez da matriz,



mesmo em um ambiente com igual gradiente de quimiotaxia, MSCs apresentaram maior migração em superfícies/substratos macios quando comparados aos mais rígidos, pela polarização do citoesqueleto e da actina funcional, informação relevante quando comparamos as placas de cultura com os tecidos biológicos propriamente ditos (SAXENA et al., 2018). O mesmo vale para a gravidade, visto que em situações de microgravidade estimulada ou modelada, houve diminuição da proliferação e migração celular por uma reorganização da F-actina e aumento da rigidez celular, fato que pode estar relacionado com o armazenamento das placas de cultura durante a incubação, uma vez que alterações na posição da placa ou até alterações nas prateleiras de armazenamento são inevitáveis na rotina laboratorial (PLETT et al., 2004; MAO et al., 2016).

O efeito positivo do CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs foram observados por meio da avaliação dos marcadores osteoblásticos clássicos como RUNX2, ALP E OPN, os mesmos avaliados por outros pesquisadores (LIAN et al., 2006; MILLÁN, 2013). A expressão gênica dos marcadores iniciais ou intermediários da progressão da diferenciação osteoblástica, *Runx2* e *Alp*, não foi afetada por CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, enquanto *Opn* foi regulado positivamente. Os marcadores ósseos fenotípicos RUNX2, ALP, expressão da proteína OPN e atividade de ALP mostraram claramente que o secretoma MSCs<sup>BMP-9</sup> aumentou a diferenciação osteoblástica das MSCs, o que concorda com o aumento da diferenciação osteoblástica das MSCs induzida pelo secretoma de células HEK-293 ou HCT116 superexpressando BMP-9 (TANG et al., 2009; LI et al., 2016). Este achado pode estar relacionado à dinâmica do processamento da informação gênica por meio da transcrição e tradução, uma vez que há uma baixa correlação entre a expressão de RNA mensageiro (RNAm) devido, em parte, aos mecanismos de regulação pós-transcrição e pós-tradução (WHITEHEAD et al., 2006; MAIER; SERRANO, 2009; LOEBEL et al., 2015).

Para abordar uma possível aplicação clínica futura, o potencial osteogênico do secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> foi avaliado em termos de sua capacidade de induzir o reparo ósseo. Em geral, os parâmetros morfométricos demonstraram maior formação óssea nos defeitos tratados com CM em comparação com os não tratados, com clara vantagem para os defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup>, o que foi corroborado pela análise histológica que também mostrou a ausência de qualquer reação adversa sinais independentemente dos tratamentos. Além disso, notou-se formação óssea no centro dos defeitos tratados com CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> próximo a vasos sanguíneos que podem estar relacionados ao potencial osteogênico e angiogênico da BMP-9 (HERRERA et al., 2013; WANG et al., 2013; SUZUKI et al., 2010). Esses achados concordam com o aumento da formação óssea observado em estudos

experimentais que usaram diferentes abordagens para fornecer BMP-9 ao local do defeito (LEE et al., 2019; ZHANG et al., 2019; FREITAS et al., 2021). Como o secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> aumentou a formação óssea, comparamos o potencial osteogênico de CM-MSCs<sup>BMP-9</sup> com MSCs<sup>BMP-9</sup>, ambos injetados diretamente em defeitos da calvária, e observamos que o secretoma foi mais eficaz do que as células para induzir o reparo ósseo. Este é um achado interessante que pode estar relacionado à entrega direta de BMP-9 combinado com o secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> ao local do defeito ósseo, em vez da necessidade de síntese e secreção de BMP-9 pelas MSCs<sup>BMP-9</sup> injetadas.

Em conclusão, o secretoma de MSCs editadas por CRISPR para superexpressarem BMP-9 favoreceu a diferenciação osteoblástica de MSCs. Inclusive, está de acordo com resultados obtidos em estudos anteriores, onde, MSCs<sup>BMP-9</sup> induziu maior formação óssea que MSCs<sup>VPR</sup> (FREITAS et al., 2021). Além disso, até onde sabemos, este é o primeiro estudo a mostrar que o secretoma de MSCs<sup>BMP-9</sup> melhorou efetivamente a formação óssea em defeitos da calvária de camundongos em comparação com o secretoma de MSCs<sup>VPR</sup> ou mesmo com as próprias MSCs<sup>BMP-9</sup>. Esses resultados promissores abrem caminho para novas investigações sobre abordagens baseadas em terapias *cell free*, como a aplicação de exossomos de MSCs<sup>BMP-9</sup> para promover a regeneração óssea de defeitos desafiadores no campo da cirurgia buco-maxilo-facial, implantodontia, periodontia e ortopedia.

## 6 CONCLUSÃO

- MSCs editadas geneticamente por CRISPR-Cas9 para superexpressar BMP-9 secretaram BMP-9 para o meio de cultura.
- O secretoma (meio condicionado) de MSCs que superexpressam BMP-9 favoreceu a diferenciação osteoblástica de MSCs quando comparado ao secretoma de MSCs que não superexpressam BMP-9.
- O secretoma de MSCs que superexpressam BMP-9 favoreceu o reparo ósseo em defeitos criados em calvárias de camundongos quando comparado ao secretoma de MSCs que não superexpressam BMP-9.
- O secretoma de MSCs que superexpressam BMP-9 favoreceu o reparo ósseo em defeitos criados em calvárias de camundongos quando comparado a MSCs que superexpressam BMP-9.

## REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L.F.; LOPES, H.B.; FREITAS GP. *et al.* Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. **Regen Med.**, v. 17, n. 6, p. 341-353, 2022.

ALBESIANO, E.; MESSMER, B.T.; DAMLE, R.N. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood.**, v. 102, n. 9, p. 3333–3339, 2003.

ALMEIDA, A.L.G.; FREITAS, G.P.; LOPES, H.B. *et al.* Effect of stem cells combined with a polymer/ceramic membrane on osteoporotic bone repair. **Braz Oral Res.**, v. 33, n. 1, p. e079, 2019.

BALL, S.G.; SHUTTLEWORTH, C.A.; KIELTY, C.M. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. **Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 3, p. 489–500, 2007.

BAR, J.K.; LIS-NAWARA, A.; GRELEWSKI, P.G. Dental pulp stem cell-derived secretome and its regenerative potential. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 21, p. 12018, 2021.

BEER, L.; MILDNER, M.; ANKERSMIT, H.J. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 7, p. 170, 2017.

BELOTI, M.M.; SICCHIERI, L.G.; DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 9-10, p. 999-1005, 2012.

BERGER, M.B.; BOSH, K.B.; JACOBS, T.W. *et al.* Growth factors produced by bone marrow stromal cells on nanoroughened titanium–aluminum–vanadium surfaces program distal MSCs into osteoblasts via BMP2 signaling. **J Orthop Res.**, v. 39, n. 9, p. 1908-1920, 2021.

BHARADWAZ, A.; JAYASURIYA, A.C. Osteogenic differentiation cues of the bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) and its recent advances in bone tissue regeneration. **Materials Science & Engineering**, v. 120, n. 1, p. 111748, 2021.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BIDART, M.; RICARD, N.; LEVET, S. *et al.* BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. **Cell Mol Life Science**, v. 69, n. 2, p. 313–324, 2012.

BLABER, S.P.; WEBSTER, R.A.; HILL, C.J. *et al.* Analysis of in vitro secretion profiles from adipose derived cell populations. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 172, 2012.

BOUXSEIN, M.L.; BOYD, S.K.; CHRISTIANSEN, B.A. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res.**, v. 25, n.7, p. 1468-1486, 2010.

BRYDONE, A.S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proc Inst Mech Eng H**, v. 224, n. 12, p. 1329-1343, 2010.

CHANG, W.; KIM, R.; PARK, S.I. *et al.* Enhanced healing of rat calvarial bone defects with hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells through increased endogenous stem cell migration via regulation of ICAM-1 targeted-microRNA-221. **Mol Cells**, v. 38, n. 7, p. 643-650, 2015.

CHEN, L.; TREDGET, E.E.; WU, P.Y.; WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008.

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F.M. *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **J Bone Joint Surg Am.**, v. 85, n. 8, p. 1544-1552, 2003.

DAVID, L.; MALLET, C.; KERAMIDAS, M. *et al.* Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. **Circ Research.**, v. 102, n. 8, p. 914-922, 2008.

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res.** 28(1): 2-17, 2013. Doi: 10.1002/jbmr.1805.

DUBON, M.J.; YU, J.; CHOI, S.; PARK, K. Transforming growth factor  $\beta$  induces bone marrow mesenchymal stem cell migration via noncanonical signals and N-cadherin. **J Cell Physiol.**, v. 233, n.1, p. 201-213, 2018.

FAMIAN, M.H.; SAHEB, S.M.; MONTASERI, A. Conditioned medium of wharton's jelly derived stem cells can enhance the cartilage specific genes expression by chondrocytes in monolayer and mass culture systems. **Adv Pharm Bull.**, v. 7, n. 1, p. 123-130, 2017.

FERRAZ, E.P.; FREITAS, G.P.; CROVACE, M.C. *et al.* Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (BioS-2P) for bone tissue engineering. **Biomed Mater.**, v. 12, n. 4, p. 045018, 2017.

FREITAS, G.P.; LOPES, H.B.; ALMEIDA, A.L.G. *et 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.**, v. 101, n. 3, p. 312-320, 2017.

FREITAS, G.P.; LOPES, H.B.; SOUZA, A.T.P. *et al.* Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. **Regen Med.**, v. 14, n. 12, p. 1107-1119, 2019a.

FREITAS, G.P.; LOPES, H.B.; SOUZA, A.T.P. *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.**, v. 9, n. 1, p. 13476, 2019b.

FREITAS, G.P.; LOPES, H.B.; SOUZA, A.T.P. *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.**, v. 28, n. 12, p. 748-759, 2021.

FU, X.; LIU, G.; HALIM, A. *et al.* Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 784, 2019.

GERSTENFELD, L.C.; CULLINANE, D.M.; BARNES, G.L. *et al.* Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J Cell Biochem.**, v. 88, n. 5, p. 873–884, 2003.

GUGLIANDOLO, A.; FONTICOLI, L.; TRUBIANI, O. *et al.* Oral bone tissue regeneration: Mesenchymal stem cells, secretome, and biomaterials. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 10, p. 5236, 2021.

HAMLET, S.M.; LEE, R.S.B.; MOON, H.J. *et al.* Hydrophilic titanium surface-induced macrophage modulation promotes pro-osteogenic signalling. **Clin Oral Implants Res.**, v. 30, n. 11, p. 1085-1096, 2019.

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.**, v. 274, n. 12, p. 2977-2985, 2007.

HERRERA, B.; GARCÍA-ÁLVARO, M.; CRUZ, S. *et al.* BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69535, 2013.

HOLMES, D. Non-union bone fracture: A quicker fix. **Nature**, v. 550, n. 7677, p. S193, 2017.

HO-SHUI-LING, A.; BOLANDER, J.; RUSTOM, L.E. *et al.* Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. **Biomaterials**, v. 180, n. 1, p. 143-162, 2018.

IONESCU, L.; BYRNE, R.N.; VAN HAAFTEN, T. *et al.* Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: In vivo evidence for stem cell paracrine action. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 303, n. 11, p. L967–L977, 2012.

KNAUS, P.; SEBALD, W. Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGF $\beta$  superfamily. **Biol Chem.**, v. 382, n. 8, p.1189–1195, 2001.

KOWALSKI, K.; KOŁODZIEJCZYK, A.; SIKORSKA, M. *et al.* Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of SDF-1/Cxcr4 and Sdf-1/Cxcr7 axis. **Cell Adhes Migr.**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 2016.

LAMPLLOT, J.D.; QIN, J.; NAN, G. *et al.* BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. **Am J Stem Cells**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2013.

- LEE, C.S.; BISHOP, E.S.; DUMANIAN, Z. *et al.* Bone Morphogenetic Protein-9-stimulated adipocyte-derived mesenchymal progenitors entrapped in a thermoresponsive nanocomposite scaffold facilitate cranial defect repair. **J Craniofac Surg.**, v. 30, n. 6, p. 1915-1919, 2019.
- LESSA, T.B.; CARVALHO, R.C.; FRANCIOLLI, A.L. *et al.* Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice. **Acta Vet Scand.**, v. 54, n. 1, p. 73, 2012.
- LI, R.; YAN, Z.; YE, J. *et al.* The prodomain-containing BMP9 produced from a stable line effectively regulates the differentiation of mesenchymal stem cells. **Int J Med Sci.**, v. 13, n. 1, p. 8-18, 2016.
- LIAN, J.B.; STEIN, G.S.; JAVED, A. *et al.* Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 7, n. 1-2, p. 1-16, 2006.
- LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.
- LIAO, J.; WEI, Q.; ZOU, Y. *et al.* Biochemistry, Notch signaling augments BMP9-induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs). **Cell Physiol Biochem.**, v. 41, n. 5, p. 1905–1923, 2017.
- LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107001, 2014.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOEBEL, C.; CZEKANSKA, E.M.; BRUDERER, M. *et al.* In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. **Tissue Eng Part A**, v. 21, n. 1-2, p. 115-23, 2015.
- LUO, J.; TANG, M.; HUANG, J. *et al.* TGF $\beta$ /BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 38, p. 29588–29598, 2010.
- MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 24, p. 3966-3973, 2009.
- MAO, X., CHEN, Z., LUO, Q. *et al.* Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2235-2243, 2016.
- MERIMI, M.; EL-MAJZOUB, R.; LAGNEAUX, L. *et al.* The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: Current knowledge and future understandings. **Front Cell Dev Biol.**, v. 9, n. 1, p. 661532, 2021.
- MILLÁN, J.L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcif Tissue Int.**, v. 3, n. 4, p. 299-306, 2013.

- MIROTSOU, M.; JAYAWARDENA, T.M.; SCHMECKPEPER, J. *et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 50, n. 2, p. 280-289, 2011.
- OSUGI, M.; KATAGIRI, W.; YOSHIMI, R. *et al.* Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 13-14, p. 1479–1489, 2012.
- PLETT, P.A.; ABONOUR, R.; FRANKOVITZ, S.M.; ORSCHELL, C.M. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. **Exp Hematol.**, v. 32, n. 8, p. 773-81, 2004.
- RAGGATT, L.J.; WULLSCHLEGER, M.E.; ALEXANDER, K.A. *et al.* Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 12, p. 3192–3204, 2014.
- SANTOS, T.S.; ABUNA, R.P.; CASTRO RAUCCI, L.M. *et al.* Mesenchymal stem cells repress osteoblast differentiation under osteogenic-inducing conditions. **J Cell Biochem.**, v. 116, n. 12, p. 2896-2902, 2015.
- SAXENA, N.; MOGHA, P.; DASH, S. *et al.* Matrix elasticity regulates mesenchymal stem cell chemotaxis. **J Cell Sci.**, v. 131, n. 7, p. 211391, 2018.
- SCHLUNDT, C.; EL KHASSAWNA, T.; SERRA, A. *et al.* Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. **Bone**, v. 106, n. 1, p. 78–89, 2018.
- SCHMIDT, A.; LADAGE, D.; SCHINKÖTHE, T. *et al.* Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 7, p. 1750–1758, 2006.
- SOUZA, A.T.P.; BEZERRA, B.L.S.; OLIVEIRA, F.S. *et al.* Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. **J Cell Biochem.**, v. 119, n. 10, p. 8441-8449, 2018.
- SOUZA, P.G.; ADOLPHO, L.F.; LOPES, H.B. *et al.* Effects of modulation of the hedgehog and notch signaling pathways on osteoblast differentiation induced by titanium with nanotopography. **J Funct Biomater.**, v. 14, n. 2, p. 79, 2023.
- SUZUKI, Y.; OHGA, N.; MORISHITA, Y. *et al.* BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. **J Cell Sci.**, v. 123, n.1, p. 1684-1692, 2010.
- SWAPNA, S.; ONKAR, S. Orthopedic implants market by product type, by biomaterial, by type: Global opportunity analysis and industry forecast, 2022-2032. **Allied Market Research**, p. 210, 2023.
- TANG, N.; SONG, W.X.; LUO, J. *et al.* BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling. **J Cell Mol Med.**, v. 13, n. 8B, p. 2448-2464, 2009.

TIMMERS, L.; LIM, S.K.; HOEFER, I.E. *et al.* Human mesenchymal stem cell- conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. **Stem Cell Res.**, v. 6, n. 3, p. 206-214, 2011.

TOTOLI, G.G.C.; BIGHETTI-TREVISAN, R.L.; FREITAS, G.P. *et al.* Association of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue enhances bone repair in rat calvarial defects. **Regen Med.**, v. 18, n. 5, p. 377-387, 2023.

TRAPANI, M.D.; BASSI, G.; MIDOLO, M. *et al.* Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. **Sci Rep.**, v. 6, n. 1, p. 24120, 2016.

TSUCHIYA, S.; OHMORI, M.; HARA, K. *et al.* An experimental study on guided bone regeneration using a polylactide-co-glycolide membrane-immobilized conditioned medium. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 30, n. 5, p. 1175-1186, 2015.

VAN BAARDEWIJK, L.J.; VAN DER ENDE, J.; LISSEBERG-THUNNISSEN, S. *et al.* Circulating bone morphogenetic protein levels and delayed fracture healing. **Int Orthop.**, v. 37, n. 3, p. 523–527, 2013.

VAN KOPPEN, A.; JOLES, J.A.; VAN BALKOM, B.W. *et al.* Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38746, 2012.

VIZOSO, F.J.; EIRO, N.; CID, S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. **Int J Mol Sci.**, v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

WALTER, M.N.; WRIGHT, K.T.; FULLER, H.R. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Exp Cell Res.**, v. 316, n. 7, p. 1271-1281, 2010.

WALMSLEY, G.G.; RANSOM, R.C.; ZIELINS, E.R. *et al.* Stem cells in bone regeneration. **Stem Cell Rev Rep.**, v. 12, n. 5, p. 524-529, 2016.

WAN, S.; LIU, Y.; WENG, Y. *et al.* BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Cell Oncology**, v. 37, n. 5, p. 363–375, 2014.

WANG, S.; LAI, X.; DENG, Y.; SONG, Y. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. **Life Sci.**, v. 242, n. 1, p. 117242, 2020.

WANG, Y.; HONG, S.; LI, M. *et al.* Noggin resistance contributes to the potent osteogenic capability of BMP9 in mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 31, n. 11, p. 1796–1803, 2013.

WEI, Z.; SALMON, R.M.; UPTON, P.D. *et al.* Regulation of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) by redox-dependent proteolysis. **J Biol Chem.**, v. 289, n. 45, p. 31150-31159, 2014.

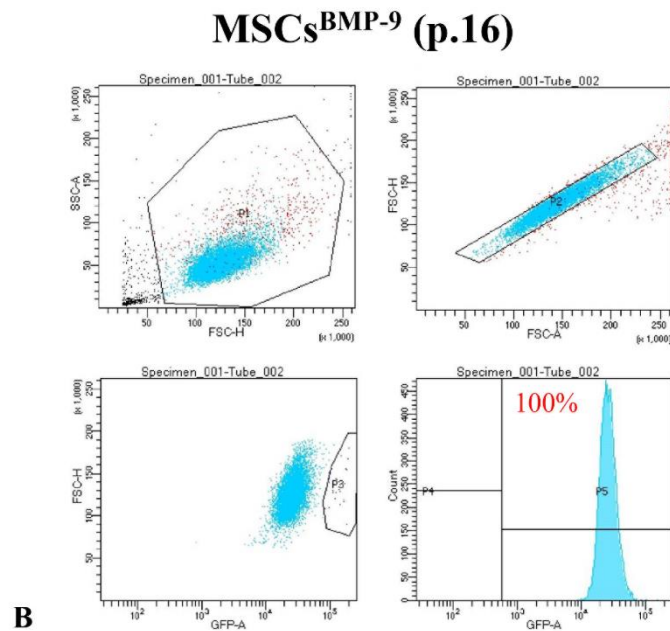
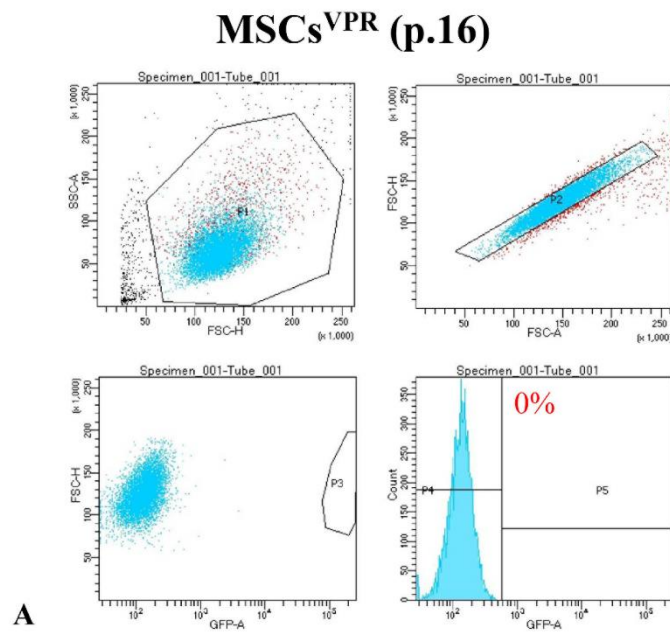
WHITEHEAD, K.; KISH, A.; PAN, M. *et al.* An integrated systems approach for understanding cellular responses to gamma radiation. **Mol Syst Biol.**, v. 2, n. 1, p. 47, 2006.



- YANG, D.; WANG, W.; LI, L. *et al.* The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59020, 2013.
- YE, F.; LI, J.; XU, P. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promotes c-Jun-dependent secretion of interleukin 8 and mediates the migration and differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. **Stem Cell Res Ther.**, v. 13, n. 1, p. 58, 2022.
- YU, Y.Y.; LIEU, S.; LU, C. *et al.* Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 841–51, 2010.
- ZAKI, S.S.O.; KANESAN, L.; LEONG, M.Y.D.; VIDYADARAN, S. The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. **Cell Biol Int.**, v. 43, n. 10, p. 1201-1204, 2019.
- ZHANG, J.; LI, L. BMP signaling and stem cell regulation. **Dev Biol.**, v. 284, n. 1, p. 1-11, 2005.
- ZHANG, R.; LI, X.; LIU, Y. *et al.* Acceleration of bone regeneration in critical-size defect using BMP-9-loaded nHA/ColI/MWCNTs scaffolds seeded with bone marrow mesenchymal stem cells. **Biomed Res Int.**, v. 2019, p. 7343957, 2019.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; DENG, F. *et al.* Determination of a critical size calvarial defect in senile osteoporotic mice model based on in vivo micro-computed tomography and histological evaluation. **Arch Gerontol Geriatr.**, v. 61, n. 1, p. 44-55, 2015.
- ZOU, C.; SONG, G.; LUO, Q. *et al.* Mesenchymal stem cells require integrin  $\beta$ 1 for directed migration induced by osteopontin in vitro. **Vitr Cell Dev Biol Anim.**, v. 47, n. 3, p. 241–250, 2011.

## APÊNDICE I

**Figura 6: Citometria de fluxo.** Confirmação da presença do RNA guia em MSCs<sup>VPR</sup> (tubo 001, passagem 16) e MSCs<sup>BMP-9</sup> (tubo002, passagem 16) aos 3 dias de cultura em meio de crescimento não indutor MEM 20% por meio da análise de marcação GFP positivo.



## ANEXO I

Termo de aprovação para realização da pesquisa, por meio da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.



### Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 045/2020

Ribeirão Preto, 17 de junho de 2020.

**Ref. processo nº 2020.1.219.58.6**

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 77ª Sessão, realizada em 17/06/2020, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Efeito do meio condicionado por células-tronco mesenquimais com superexpressão de proteína óssea morfogenética 9 na diferenciação osteoblástica e na regeneração óssea", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 30/07/2022**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

**Prof. Dra. Andiara De Rossi Daldegan**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

**Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**

Departamento de Biologia Básica e Oral  
desta Faculdade

AAFN/vgpr

## ANEXO II

Relatório final de atividades realizadas em estágio de pesquisa no exterior (BEPE-FAPESP).

**cnio** stop cancer

Spanish National  
Cancer Research Centre  
(CNIO)

Maria A. Blasco, Ph.D.  
*Director*

Madrid, 13<sup>th</sup> February, 2023

To whom it may concern,

I declare that **Robson Diego Calixto**, a postgraduate student (master) in Oral Biology at the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP) of the University of São Paulo (USP) carried out his fellowship (BEPE-FAPESP) in the **Telomeres and Telomerases Group**, under my supervision, from **4<sup>th</sup> August 2022 to 30<sup>th</sup> January 2023**, where he developed the research project entitled “*Reprogramming differentiated somatic cells into inducible pluripotent cells (iPS) as a tool for regenerative medicine*” with exclusive dedication.

Yours sincerely,



**Maria A. Blasco**  
Scientific Director of the Spanish National Cancer Research Center  
Telomeres and Telomerase Group  
Spanish National Cancer Center (CNIO)  
3 Melchor Fernandez Almagro Street  
28029 Madrid - Spain

Melchor Fernández Almagro, 3  
28029 Madrid, Spain  
Phone (+34) 91 7328000  
www.cnio.es



**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS  
PROGRAMA DE ONCOLOGÍA MOLECULAR  
GRUPO DE TELÓMEROS Y TELOMERASA**

**cnio**

**REPORTE FINAL DE ACTIVIDADES – BECA DE PRÁCTICAS DE INVESTIGACIÓN EN EL EXTERIOR**  
PROCESO BEPE-FAPESP: 2022/00168-8  
PLAZO DE VALIDEZ DE LA BECA: 04/08/2022 – 30/01/2023

**REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS DIFERENCIADAS EN CÉLULAS  
PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSs) COMO HERRAMIENTA DE MEDICINA REGENERATIVA**  
PERÍODO DE REFERENCIA POR EL REPORTE CIENTÍFICO: 08/2022 – 01/2023

ROBSON DIEGO CALIXTO

BECÁRIO

PROF. DR. MÁRCIO MATEUS BELOTI

SUPERVISOR EN EL PAÍS DE ORIGEN

DRA. MARÍA ANTONIA BLASCO MARHUENDA  
SUPERVISORA EN EL PAÍS DE DESTINO

**MADRID / ES  
2023**

## 1 RESUMEN DEL PROYECTO PROPUESTO

La terapia celular con células madre derivadas de diferentes tejidos corporales ha sido objeto de investigaciones científicas en el campo de la salud por ser una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades óseas. Entre los tipos conocidos de células madre, se sabe que las células madre embrionarias (ES) tienen una alta plasticidad y un gran potencial de autorrenovación, lo que aumenta su capacidad de diferenciarse en todos los tejidos del cuerpo, excepto los anexos embrionarios. Para saltar los problemas éticos de obtención de las mismas y aspectos moleculares de inmunocompatibilidad, la aparición de células pluripotentes inducidas (iPSs), obtenidas a partir de la reprogramación génica de células somáticas, se presenta como una alternativa viable en el campo de la medicina regenerativa, la cual puede conducir a la generación de diversos linajes celulares con fenotipos específicos, como los osteoblastos (OBs). En este contexto, los objetivos de este proyecto fueron (1) inducir la reprogramación de fibroblastos embrionarios (MEFs) obtenidos de ratones para convertirlos en células pluripotentes inducidas en un modelo *in vitro* y (2) evaluar el potencial de diferenciación de estas células reprogramadas en OBs obtenidos a partir de una inducción físico-química *in vitro*. Los datos cuantitativos se sometieron a una prueba de normalidad para determinar la prueba estadística adecuada y, posteriormente, se analizaron utilizando el software *Statistical Package for Social Science* (SPSS, IBM, EE. UU., v. 24.0) con un nivel de significancia establecido en 5%. Al someter las iPSs reprogramadas de MEFs en cultivo con medio de diferenciación osteogénica, se notó un efecto estadísticamente significativo tanto en el ámbito genotípico como fenotípico en las OBs inducidas por diferenciación físico-química, donde hubo un aumento en la expresión génica y proteica de marcadores osteoblásticos importantes en este proceso además de un aumento de la actividad fenotípica de ALP *in situ* y mineralización de la matriz extracelular de OBs obtenidos a partir de iPSs. Además, nos dimos cuenta de que esta inducción físico-química para la diferenciación es capaz de conducir a alteraciones considerables de los marcadores genéticos de los componentes del complejo Shelterin de telómeros y componentes de la telomerasa, lo que puede influir en los patrones epigenéticos y el éxito de la diferenciación osteoblástica de las iPSs. Así, a través de este estudio pudimos probar nuestra hipótesis y demostrar que estas células tienen un gran potencial osteogénico para su uso en terapia celular y medicina regenerativa dirigida a enfermedades del tejido óseo.

**Palabras clave:** células pluripotentes inducidas; tejido óseo; osteoblasto; terapia celular, telómeros y telomerasa.

## 2 ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERIODO

Este reporte final describe las actividades científicas desarrolladas entre agosto de 2022 y enero de 2023, durante el desarrollo de la pasantía de investigación en el extranjero (proceso BEPE-FAPESP n° 2022/00168-8). El proyecto de investigación en cuestión se desarrolló con el “Grupo de Telómeros y Telomerasa” del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid/ES, bajo la supervisión de la Dra. María Antonia Blasco Marhuenda y co-supervisión del Dr. Márcio Mateus Beloti de la Facultad de Odontología de Ribeirão Preto (FORP-USP).

En los primeros días como integrante del grupo, además de las pautas generales de funcionamiento del centro, participé de varias capacitaciones teóricas y prácticas, entre ellas el

curso de bioseguridad para trabajos de laboratorio, curso de cultivo celular, curso de manipulación de organismos genéticamente modificados y el curso de brigada de fuego. Además, el centro me permitió clases semanales para la mejora tanto del español como la lengua inglesa.

Tras superar la prueba final realizada por el CNIO respecto a los cursos de formación realizados, se me permitió el acceso a las salas de cultivo celular y edición de genes, pudiendo así iniciar mis propios experimentos. Como el período de prácticas de investigación en el extranjero era de solo 6 meses, se decidió que no tomaría el curso específico para el manejo de animales en el centro ya que este duraría 9 meses; así, acompañé a una investigadora del grupo, la Dra. Rosa María Marion, en la obtención de fibroblastos embrionarios (MEFs) obtenidos de ratones gentilmente donados por ella para el desarrollo de esta investigación.

Tras la obtención de las células MEFs, iniciamos el proceso de reprogramación celular mediante la sobreexpresión de los factores Yamanaka (los genes *Sox2*, *Oct4* y *Klf4*) inducida por la construcción de un retrovirus en células HEK-293T para posteriormente realizarnos las infecciones seriadas del cultivo primario de las células MEFs. Una vez realizado este proceso, se estimuló la reprogramación cambiando diariamente el medio de cultivo de iPSs, hasta obtener las colonias reprogramadas. Debido ser un experimento complejo, tuvimos que repetir este proceso cuatro veces, probando diferentes concentraciones y combinaciones de polibreno y virus, hasta lograr la reprogramación de las células.

Una vez obtenidas las iPSs, comenzamos la segunda etapa del proyecto, que consistió en evaluar el potencial osteogénico de estas células reprogramadas para diferenciarse en osteoblastos *in vitro* mediante diferenciación físico-química utilizando un medio de diferenciación osteoblástica (medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico, beta-glicerol fosfato y dexametasona) bien consolidados en la literatura y ampliamente utilizados por nuestro grupo de investigación en la FORP-USP para la diferenciación de células-madre mesenquimales (MSCs). Inicialmente, en el proyecto original presentado a la FAPESP, nos comprometimos a realizar dos pruebas fenotípicas para evaluar el potencial osteogénico de estas células: el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) *in situ* y el ensayo para evaluar la matriz extracelular mineralizada. Así, además de llevar a cabo lo previsto, también completamos la metodología de este estudio evaluando el grado de éxito del experimento de transfección mediante la evaluación de la expresión génica relativa de los factores de Yamanaka por la técnica de PCR en tiempo real, caracterización morfológica de iPSs y la expresión génica y proteica de sus marcadores de identidad por la técnica de PCR en tiempo real y Western Blot, ensayo de viabilidad celular por fluorescencia directa y la evaluación de la expresión génica de

marcadores osteoblásticos también por la técnica de PCR en tiempo real y Western Blot . Como el tiempo de experimentación fue limitado y considerando el objetivo y el enfoque del grupo de investigación al que estuve insertado, como una forma de contribuir con los datos del grupo, también evaluamos la expresión génica por PCR en tiempo real de marcadores del complejo Shelterin asociados con la actividad de los telómeros así como los marcadores de actividad de la telomerasa, que es la responsable del correcto funcionamiento de los telómeros. Estos datos adicionales, además de contribuir al conocimiento del grupo, también abren muchas posibilidades para futuros estudios, pensando principalmente en la regulación epigenética de las células iPSs durante la diferenciación osteoblástica.

Actualmente, el CNIO, el espacio al que me dediqué en este proyecto, es un centro de renombre internacional y está considerado como el mayor centro de investigación en oncología de Europa. Dirigido por la Dra. María Blasco, investigadora con más de 36.000 citas científicas y un índice h de 101 en la plataforma Scopus, tiene una amplia experiencia en estudios relevantes para la edición de genes utilizando un espectro de enfoques de biología molecular y bioingeniería genética, principalmente en el estudio de iPSs y regulación epigenética de telómeros y telomerasa para el tratamiento de enfermedades oncológicas. Su grupo de investigación está formado por 15 investigadores doctores y posdoctorales de 13 países distintos (España, Portugal, Italia, Francia, India, Dinamarca, China, Grecia, Reino Unido, México, Holanda, Alemania y Arabia Saudita), con los que nos reunimos semanalmente para discutir todos los experimentos realizados por el grupo. Además de este intercambio de experiencias profesionales y culturales, la experiencia con la Dra. Blasco también me permitió contactar con varios investigadores internacionales fuera del centro, en lo que, además de las ponencias presentadas por mí en otros lugares de Europa, también me permitió tener contacto directo con el Dr. Yamanaka, el ganador del Premio Nobel de Medicina en 2012 por el descubrimiento de las iPSs (Adjunto 1 e 2).

Resaltamos que los logros académicos adquiridos a partir de esta experiencia en el exterior impactarán positivamente a nuestro grupo de investigación de la FORP-USP a partir de ahora, tanto desde el punto de vista técnico como intelectual. Además del proceso de internacionalización y la sólida alianza establecida con un laboratorio de gran reconocimiento, nuestra perspectiva y herramientas se han incrementado en la búsqueda de un tratamiento totalmente efectivo para las enfermedades que afectan el tejido óseo, a través de la terapia celular y la medicina regenerativa. Como una forma de transferir el conocimiento obtenido, continuaremos este estudio a través de un proyecto de doctorado (que ya presentamos a la



FAPESP para solicitar una beca regular - proceso n° 2023/00538-2), además de escribir artículos y resúmenes en congresos académicos de circulación nacional e internacional.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Investigar el potencial de las células pluripotentes inducidas (iPSs) en la diferenciación de osteoblastos (OBs) *in vitro* a partir de la reprogramación biomolecular de células somáticas diferenciadas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Inducir la reprogramación de fibroblastos embrionarios (MEFs) obtenidos de ratones para que se conviertan en iPSs en un modelo *in vitro*;
- Evaluar el potencial de diferenciación de iPSs a OBs a partir de la inducción físico-química en un modelo *in vitro*.

### **4 MATERIALES Y MÉTODO**

#### **4.1 Cultura y generación de células iPSs de ratón**

La reprogramación de MEFs primarios derivado de embriones de ratón *C57BL6* tipo salvaje, cultivados en medio DMEM con FBS al 10% (Lonza, Bélgica) – fue realizado esencialmente como si se describió Blelloch et al. (2007). Después del cultivo y expansión de los MEFs, se reprogramó las iPSs a través de una infección retroviral. Próximamente fueron producidas sumas retrovirales en células HEK-293T ( $5 \times 10^6$  células por placa de 100 mm de diámetro) y transfectadas con 4  $\mu\text{g}$  del plásmido de empaquetamiento ecotrópico pCL-Eco (#12371, Addgene, USA) junto con 4  $\mu\text{g}$  de las siguientes construcciones retrovirales: pMXs-Sox2 (#13367, Addgene), pMXs-Oct4 (#13366, Addgene) y pMXs-Klf4 (#13370, Addgene). Las transfecciones fueron realizadas utilizando el reactivo de transfección Fugene-6 (#E269A, Promega, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A los 2 días, se recogieron los 10 mL en serie de los sobrenadantes retrovirales durante las siguientes 48 horas a intervalos de 12 horas, añadiendo cada vez medio fresco a las células (10 mL). Las células MEFs fueron sembradas en el día anterior ( $1-3 \times 10^5$  células por placa de 60 mm de diámetro) y recibió 1 mL de cada uno de los sobrenadantes retrovirales correspondientes (ya sea un total de tres). Este procedimiento se repitió cada 12 h durante 2 días (un total de cuatro adiciones). Una vez completada la infección, el medio se reemplazó con medio ES estándar (Sigma-Aldrich, EUA). Los cultivos se mantuvieron con cambios diarios de medio. Tan pronto como 15 días después,

las colonias con morfología similar a ES se hicieron visibles en el microscopio. Las colonias se recogieron después de 2-3 semanas y se expandieron en *feeders* inactivos de fibroblastos utilizando procedimientos estándar. Para la cuantificación de la eficiencia de la transfección retroviral de las células HEK-293T se midió la expresión génica relativa. Ya para la cuantificación de la eficiencia de generación y caracterización de las iPSCs por la transducción retroviral, además de la visualización de la morfología microscópica muy específica, se midió la expresión génica de *Nanog Homeobox (Nanog)* y *Octamer-Binding Transcription Factor 4 (Oct4)*, así como la expresión proteica relativa de NANOG.

#### 4.1.1 Evaluación de la eficiencia de la transfección retroviral de HEK-293T por PCR en tiempo real

A las 24 horas después de la última transfección retroviral de las células HEK-293T con los factores de Yamanaka, se evaluó la expresión de los genes *SRY-Box Transcription Factor 2 (Sox2)*, *Oct4* y *KLF-Transcription Factor 4 (Klf4)* mediante la técnica de PCR en tiempo real. La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy® Mini Handbook (#HB-0435, Qiagen, EUA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Luego, se cuantificó el ARN total a partir de 2 µL de muestra en el dispositivo NanoVue (GE Healthcare, EUA) y se determinó su integridad mediante electroforesis microfluídica utilizando el dispositivo Agilent Bioanalyzer 2100 y ARN 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, EUA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La caracterización del ARN mensajero de buena calidad se verificó visualizando dos subunidades ribosómicas características de los eucariotas (18S y 28S). Luego, la hebra de ADN complementaria (cADN) se hizo a partir de 1 µg de ARN total. Este procedimiento se realizó en el termociclador MWG Biotech Primus 96 Plus Digital PCR Thermal Cycler (Wave Biotech, EUA) mediante reacción con la enzima transcriptasa inversa, utilizando el kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708890, Bio-Rad, EUA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión génica se realizaron utilizando el sistema de sonda Sybr Green utilizando el kit GoTaq® Master Mix (#M7123, Promega) en un dispositivo StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, EUA). Las reacciones se realizaron por triplicado (n = 3) con un volumen final de 15 µL que contenía 7,5 µL del GoTaq Master Mix (2X), 3,5 µL de agua Nuclease-Free, 1 µL del primer reverse del gene diana, 1 µL del primer forward del gene diana y 2 µL del cADN. La reacción de amplificación consistió en una secuencia de 2 minutos a 95°C para la desnaturalización, 40 ciclos en 60°C por 20 segundos para el anillamiento, 30 segundos a 72°C para la extensión y una extensión final a 72°C por un

tiempo de 5 minutos. En la secuencia fue realizada la curva de disociación para la verificación de la especificidad de los productos de la amplificación.

Los resultados fueron analizados en base al valor de Ct (*Cycle threshold*) y normalizados por el gene de referencia *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2β (Eif2β)*, según el método comparativo de  $2^{-ddCt}$  (Livak y Schmittgen, 2001), siendo el control las células HEK-293T que no pasaron por transfección retroviral. Las secuencias *forward* y *reverse* de los genes se encuentran en la tabla 1

**Tabla 1:** Secuencias *sense* y *anti-sense* de los *primers* de ratón utilizados para el RT-PCR.

| Gene         | Primers sense (F) e anti-sense (R)<br>(secuencia 5' → 3') |
|--------------|---|
| <i>Sox2</i>  | GGACTTCTTTTGGGGACT<br>CGCCTAACGTACCACTAGAAGTTT            |
| <i>Oct4</i>  | CAGCAGATCACTCACATCGCCA<br>GCCTCATACTCTTCTCGTTGGG          |
| <i>Klf4</i>  | GAAGACGAGGATGAAGCTGAC<br>TGGACCTAGACTTTATCCTTTCC          |
| <i>Eif2β</i> | ACCTCCCTGGAATACTCTGACT<br>TCGCCCGTCTTTGATGAAT             |

#### 4.1.2 Evaluación de la eficiencia de la generación de iPS por PCR en tiempo real

A los 3 días, se evaluó la expresión génica de *Nanog* y *Oct4* mediante la técnica de PCR en tiempo real en células iPSs generadas y las MEFs utilizadas en el proceso de reprogramación celular, como se describió en la sección anterior. Las secuencias *forward* y *reverse* de los genes se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2:** Secuencias *sense* y *anti-sense* de los *primers* de ratón utilizados para el RT-PCR.

| Gene         | Primers sense (F) e anti-sense (R)<br>(secuencia 5' → 3') |
|--------------|---|
| <i>Nanog</i> | GAACGCCTCATCAATGCCTGCA<br>GAATCAGGGCTGCCTTGAAGAG          |
| <i>Oct4</i>  | CAGCAGATCACTCACATCGCCA<br>GCCTCATACTCTTCTCGTTGGG          |

#### 4.1.3 Evaluación de la eficiencia de la generación de iPS por western blot

A los 3 días, se evaluó la expresión de la proteína NANOG (42 kDa) mediante la técnica de western blot. Las células iPSs y MEFs fueran lisadas con tampón RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) mediante ultrasonido (Misonix, EUA) y la proteína total se cuantificó en el dispositivo NanoVue (GE Healthcare) utilizando una longitud de onda de 280 nm. Utilizaron geles de acrilamida NUPAGE 4-12% Bis Tris Gel 1,5mm x 10 well (Invitrogen) ensamblados en aparato propio y con tampón de corrida. Se utilizaron muestras que contenían 30 µg de proteína y, para identificar el peso molecular de las proteínas, se utilizó el marcador Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories) que identificó bandas entre 10 y 250 kDa. Las proteínas se transfirieron de los geles a la membrana Amersham Protan Premiun 0,45 µm NTC – Nitrocellulose Blotting Membrana (Cytiva, Reino Unido) utilizando un aparato

de transferencia húmeda (Bio-Rad Laboratories). La membrana se mantuvo durante 1 hora en tampón salino con Tris y Tween-20 al 0,1 % (TBS-T, Sigma-Aldrich) que contenía leche desnatada al 5 % (Bio-Rad Laboratories) para bloqueo de los sitios inespecíficos. Después de bloquear los sitios no específicos, la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico anti-NANOG (conejo monoclonal, 1:1000, Cell Signaling, #8822) y luego con el anticuerpo secundario conjugado IRDye 800CW IgG durante 40 minutos a temperatura ambiente (anti-conejo, 1:10000, Li-Color, #926-32211). Para la inmunodetección se utilizó el reactivo Western lightning plus-ECL (Perkin Elmer Life Sciences, EUA) y el sistema de adquisición de imágenes en gel G-Box (Syngene). Para el marcaje de la proteína constitutiva, se trató la membrana con Re-blot Plus Strong (Millipore, EUA) y se incubó durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-SMC1 (monoclonal de conejo, 1:10000, Bethyl Laboratories, #A300-055A) y luego con el anticuerpo secundario conjugado IRDye 800CW IgG durante 40 minutos a temperatura ambiente (anti-conejo, 1:10000, Li-Cor, #926-32211) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes de las bandas relacionadas con la expresión de las proteínas de interés se adquirieron mediante el equipo de gel G-Box (Syngene, Reino Unido) y los datos cuantitativos (n = 3) se obtuvieron mediante el software GeneSnap (SynGene). La expresión de la proteína constitutiva SMC1 (165 kDa) se utilizó para normalizar la expresión de la proteína evaluada.

#### **4.2 Diferenciación de iPS en osteoblastos (OB) y evaluación del potencial osteogénico**

Las iPS derivadas de las MEFs se obtuvieron como se describió en el ítem 4.1 y se cultivó en la densidad de  $1 \times 10^4$  células/pozo para placas de cultivo de 24 pozos (Corning Incorporated) y  $2 \times 10^5$  células/pozo para placas de cultivo de 24 pozos (Corning Incorporated) que contenían medio osteogénico. Este medio osteogénico estaba compuesto por el medio inductor de no diferenciación suplementado con 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich) y dexametasona a  $10^{-7}$  M (Sigma-Aldrich). En cuanto al medio no inductor, estaba compuesto por un medio mínimo esencial D-MEM (Invitrogen-Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco-Life Technologies) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco-Life Technologies). Se analizó la viabilidad celular de las iPSs y para evaluar el potencial osteogénico sobre las células iPS, se evaluó la expresión génica y proteica de marcadores osteoblásticos, así como la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) *in situ* y la formación de matriz extracelular mineralizada.

##### 4.2.1 Viabilidad celular

A las 0, 24, 72 y 120 horas se evaluó la viabilidad celular de las células iPSs sometidas y no sometidas al cultivo en medio osteogénico (MTS), mediante el conteo del número total de células por fluorescencia. Para eso, se preparó una mezcla de conteo utilizando 18 µL de la muestra de células a contar más 2 µL del marcador fluorescente *Acridine Orange / Propidium Iodide Stain* (Logos Biosystems, Francia) almacenado en la nevera a 4°C. Después de la preparación, la mezcla fue añadida en una lámina de lectura propia en el dispositivo *LUNA FL™ Dual Fluorescende Cell Counter* (Logos Biosystems) para contaje. Las células nucleadas con fluorescencia verde se consideraron viables, ya que el naranja de acridina impregna la membrana de las células viables y se une a los ácidos nucleicos, emitiendo una fluorescencia verde cuando se une al dsDNA.

#### 4.2.2 Expresión génica de los marcadores osteoblásticos por PCR en tiempo real

A los 3, 5, 7, 10, 14, 17 y 21 días, se evaluó la expresión génica de *Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2)*, *Osteocalcin (Oc)* y *Osterix (Osx)* mediante la técnica de PCR en tiempo real en las células iPSs cultivadas en medio osteogénico, como se describió en la sección 4.1.1. Las secuencias *forward* y *reverse* de los genes se encuentran en la tabla 3. Las significancias estadísticas se encuentran en la tabla 4 (Apéndice 1), una vez que no fue posible añadirlas en la representación gráfica.

**Tabla 3:** Secuencias *sense* y *anti-sense* de los *primers* de ratón utilizados para el RT-PCR.

| Gene         | Primers sense (F) e anti-sense (R)<br>(secuencia 5' → 3') |
|--------------|---|
| <i>Runx2</i> | ATACCCCCTCGCTCTCTGTT<br>ACATAGGTCCCCATCTGCCT              |
| <i>Oc</i>    | TTCTGCTCACTCTGCTGACC<br>GCTTGGACATGAAGGCTTTGT             |
| <i>Osx</i>   | TGCTTCCCAATCCTATTTGC<br>AGCTCAGGGGGAATCGAG                |

#### 4.2.3 Expresión proteica del marcador osteoblástico por western Blot

A los 14 días, se evaluó la expresión proteica de RUNX2 (55-52 kDa) mediante la técnica de western blot en las células iPSs cultivadas en medio osteogénico, como se describió en la sección 4.1.3.

#### 3.2.4 Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) in situ

A los 10 días de cultivo en medio osteogénico, la actividad de ALP *in situ* fue evaluada cualitativamente por el método de coloración roja de la reacción de ligación sustrato y enzima fosfatasa alcalina (ALP). Se retiró el medio de cultivo y se lavó los pozos con solución salina tamponada con fosfato – PBS (Sigma-Aldrich) que estaba en temperatura ambiente. Las células

fueron fijadas en los pozos con 1 mL de solución de Formalina 10% y mantenidas en la nevera por 24 horas a 4°C. Después, para la deshidratación, quitó la solución de Formalina 10% y se añadió la siguiente secuencia de alcohol: 1 mL de alcohol 30% por durante 1 hora en temperatura ambiente, 1 mL de alcohol 50% por durante 1 hora en temperatura ambiente y 1 mL de alcohol 70% por durante 1 hora en temperatura ambiente. Para la coloración de los pozos utilizó el kit *Vector® Red Substrate Alkaline Phosphatase* (#SK-5100, Vector Laboratories, USA), donde para el preparo de la solución de trabajo del substrato se añadió 5 mL del tampón Tris-HCl 100 mM - 200 mM con pH 8,2 - 8,5 con 2 gotas ( $\approx 80 \mu\text{l}$ ) del Vector Red Reagente 1, 2 gotas ( $\approx 80 \mu\text{l}$ ) del Vector Red Reagent 2 y 2 gotas ( $\approx 80 \mu\text{l}$ ) del Vector Red Reagent 3 que estaban almacenados en la nevera a 4°C. La placa se quedó durante 30 minutos en temperatura ambiente. Luego, se retiró la solución de los pozos, se lavó con solución de PBS y se permitió el secado de la placa para la adquisición de las imágenes macroscópicas de los pozos ( $n = 5$ ) que contenían los cultivos. Las imágenes se obtuvieron digitalmente con cámara de alta resolución (Canon EOS Digital Rebel) de 6.3 megapíxeles, con lente macro EF100 f/2.8. Los datos se representaron a través del porcentaje de área corado de las imágenes obtenidas, medido por el software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health, USA).

#### 4.2.5 Formación de matriz extracelular mineralizada

A los 21 días de cultivo en medio osteogénico, se detectó la formación de matriz extracelular mineralizada mediante tinción con *Alizarin S Red* (Sigma-Aldrich). Se lavó los pozos del cultivo con solución de Hanks, los fijó en alcohol etílico al 70% a 4°C durante 60 minutos y se lavó en solución salina tamponada con fosfato – PBS y agua destilada. Luego, se coloró con la solución de *Alizarin S Red* (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4.2, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se lavó los pozos con PBS y agua destilada. Luego, se retiró la solución, se lavó los pozos con PBS seguido de agua destilada y se puso la placa en la temperatura ambiente para permitir el secado y la adquisición de las imágenes macroscópicas de los pozos ( $n = 5$ ) que contenían los cultivos. Las imágenes se obtuvieron digitalmente con cámara de alta resolución (Canon EOS Digital Rebel) de 6.3 megapíxeles, con lente macro EF100 f/2.8. Los datos se representaron a través del porcentaje de área corado de las imágenes obtenidas, medido por el software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health, USA).

### **4.3 Perfil da expresión de genes asociados a los telómeros y la telomerasa durante da diferenciación osteoblástica**

A los 3, 5, 7, 10, 14, 17 y 21 días, se evaluó la expresión de los genes del complejo shelterin del telómero - *Telomeric Repeat Binding Factor 1 y 2 (Trf1 y Trf2)*, *Repressor / Activator Protein 1 (Rap1)*, *Interacting Protein 2 (Tin2)*, *Tripeptidyl-Peptidase 1 (Ttp1)*, *POT1-Interacting Protein (Tpp1)* y *Protection of Telomeres Protein 1a y 1b (Pot1a y Pot1b)* - y los genes asociados a la telomerasa - *Telomerase Reverse Transcriptase (Tert)* y *Telomerase RNA Component (Terc)* - mediante la técnica de PCR en tiempo real en las células iPSs cultivadas en medio osteogénico, como se describió en la sección 4.1.1. Las secuencias *forward* y *reverse* de los genes se encuentran en la tabla 5. Las significancias estadísticas se encuentran en la tabla 6 (Apéndice 2), una vez que no fue posible añadirlas en la representación grafica.

**Tabla 5:** Secuencias *sense* y *anti-sense* de los *primers* de ratón utilizados para el RT-PCR.

| Gene         | Primers sense (F) e anti-sense (R)<br>(secuencia 5' → 3') |
|--------------|---|
| <i>Trf1</i>  | TCCACTCCCTTTTCCAACAC<br>CCTCGCTTCTCATTTTCCA               |
| <i>Trf2</i>  | ACCCGCCACAAACACAAG<br>TCCTCCTCCAACAGCAATCT                |
| <i>Rap1</i>  | CCGCTACCTCAAGCACCTAC<br>TTCTGTGGCTCTCCGCTATC              |
| <i>Tin2</i>  | GACACTCATCACCGCCTCTT<br>ACTCCTTCCCTTCTTCTGG               |
| <i>Pot1a</i> | TGTCCCGTCATCCAGAGTG<br>CCTTTCAGCCCCGTTCTCT                |
| <i>Pot1b</i> | GTGGATGGAGTGTTCATTTCTCCTA<br>CTAAGAAAGCTTCCGATCTTTAGGG    |
| <i>Tpp1</i>  | CTACTGGGTGGTCAGCAACA<br>AGCCGTGGGTTACATCAAAG              |
| <i>Tert</i>  | TGACCAGCGTGTAGGAAGA<br>CAGGAGGAAAGGAGCCAGA                |
| <i>Terc</i>  | GGTCTTTTGTCTCCGCCCG<br>CTCCTGCGCTGACGTTTGT                |

#### 4.4 Análisis estadístico

Todos los datos cuantitativos fueron sometidos a la prueba de adherencia a la curva normal y homogeneidad de las varianzas. Si se detectó la normalidad de los datos, se aplicó la prueba ANOVA seguida de su prueba *post-hoc* cuando necesario. De lo contrario, una vez que la distribución de los datos no fue normal, los datos fueron sometidos a la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguida también de su prueba *post-hoc* cuando necesario. Los datos fueron analizados en el software *Statistical Package for Social Science (SPSS, IBM, USA, v.24.0)* con un nivel de significancia establecido en el 5% ( $p < 0,05$ ).

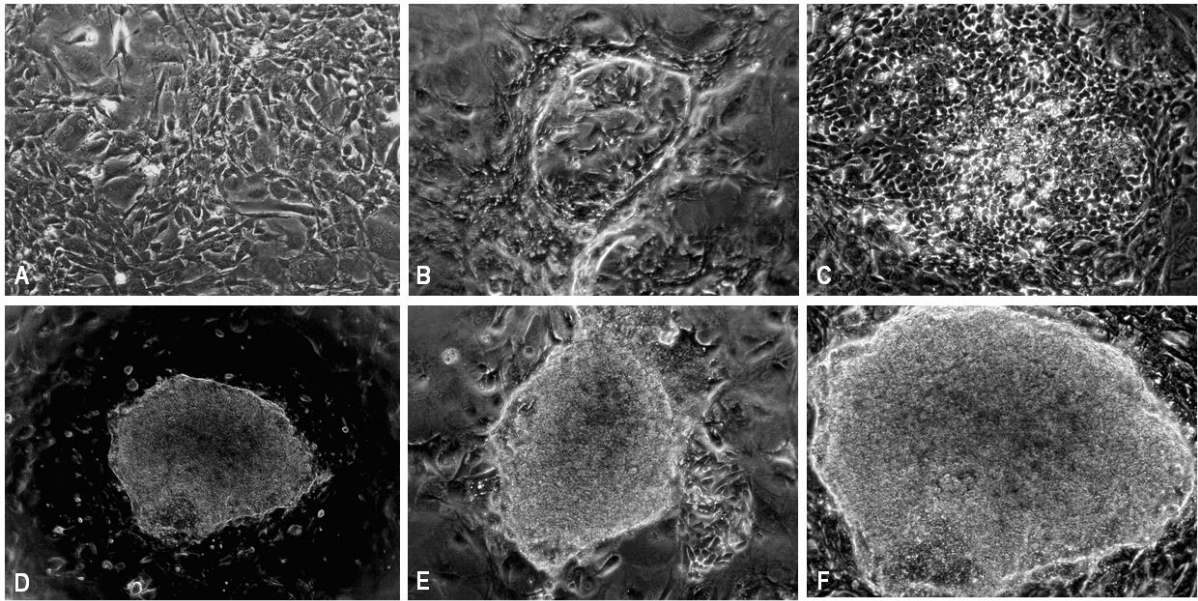
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cultivo y generación de células iPSs de ratones

Los pasos de la reprogramación celular de MEFs a iPSs se muestran en la figura 1. Se observa que, luego después de las infecciones con las construcciones virales generadas en

células HEK-293T, asociadas a una concentración ideal de polibreno en células MEFs en cultivo primario, hubo la estimulación de la reprogramación entre el día 10 y 15 de cultivo, siendo que en el día 16 las colonias ya estaban lo suficientemente maduras para ser recolectadas y transferidas, como se esperaba.

**Figura 1:** Etapas de la reprogramación celular de MEFs en iPSs vistas por microscopía óptica. **A)** Cultivo celular de MEFs sin el medio de reprogramación, **B)** Inicio de formación de colonia iPSts en 10 días (x10), **C)** Vista del núcleo celular de la colonia en proceso de formación (x40), **D)** Desarrollo de colonia en 15 días (x4), **E)** Desarrollo de colonias en 15 días (x10) y **F)** Maduración de colonias en 16 días (x10).

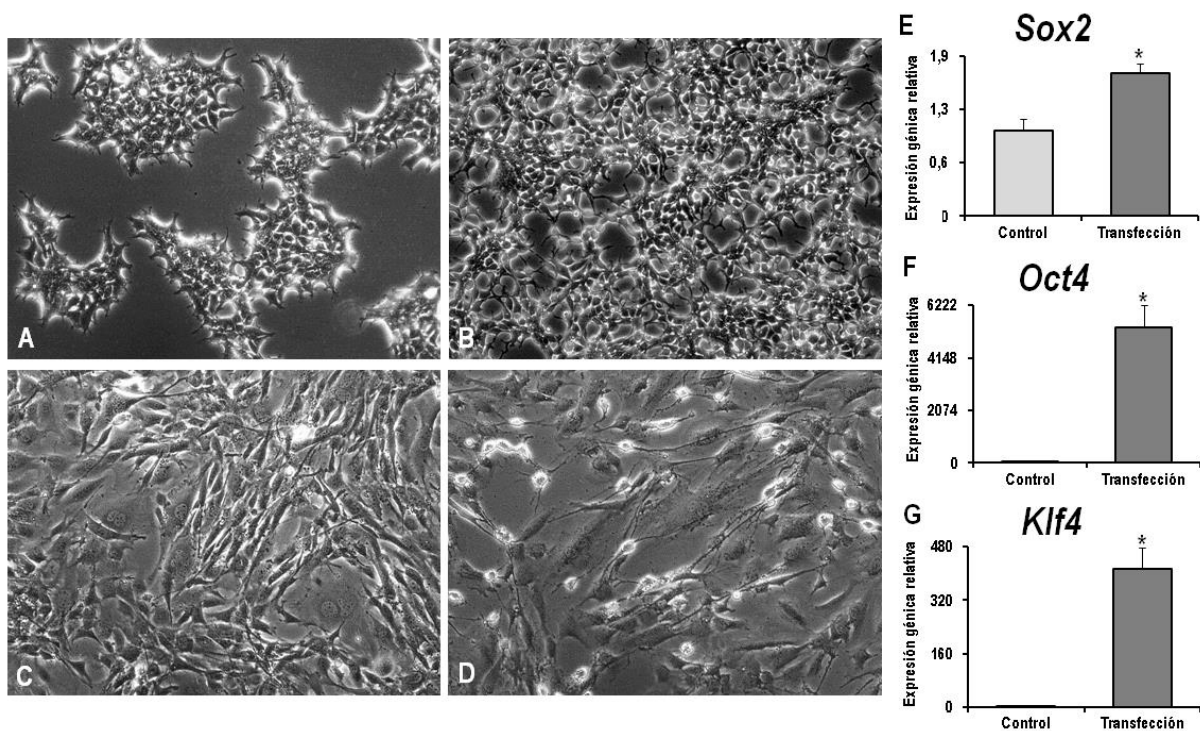


### 5.1.1 Evaluación de la eficiencia de la transfección retroviral de HEK-293T por PCR en tiempo real

Para confirmar la eficiencia de transfección de las células HEK-293T (pasaje 2) utilizadas para construcciones retrovirales de los factores de Yamanaka, se evaluó la expresión génica relativa en estas células mediante RT-PCR 24 horas después de la última transfección, como se muestra en la figura 2. Se observó que tanto para el gene *Sox2*, *Oct4* y *Klf4* hubo un aumento en la expresión relativa en las células transfectadas en comparación con las células del grupo control que no fueron transfectadas ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.0001$  y  $p = 0.0001$  respectivamente), demostrando que hubo eficiencia en el proceso de transfección retroviral.

**Figura 2:** Eficiencia de la transfección de HEK-293T para la sobreexpresión de los factores de Yamanaka. **A)** Cultivo de células HEK-293T no transfectadas (x10), **B)** Cultivo de células HEK-293T 24 horas después de la transfección retroviral (x10), **C)** Cultivo de células MEFs que no recibieron las construcciones retrovirales producidas por HEK-293T, **D)** Cultivo de células MEFs 24 horas después de recibir las construcciones retrovirales producidas por HEK-293T para la sobreexpresión de los factores de la reprogramación, **E)** Representación gráfica de la expresión del gene *Sox2*, **F)** *Oct4* y **G)** *Klf4*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , prueba t para muestras independientes).



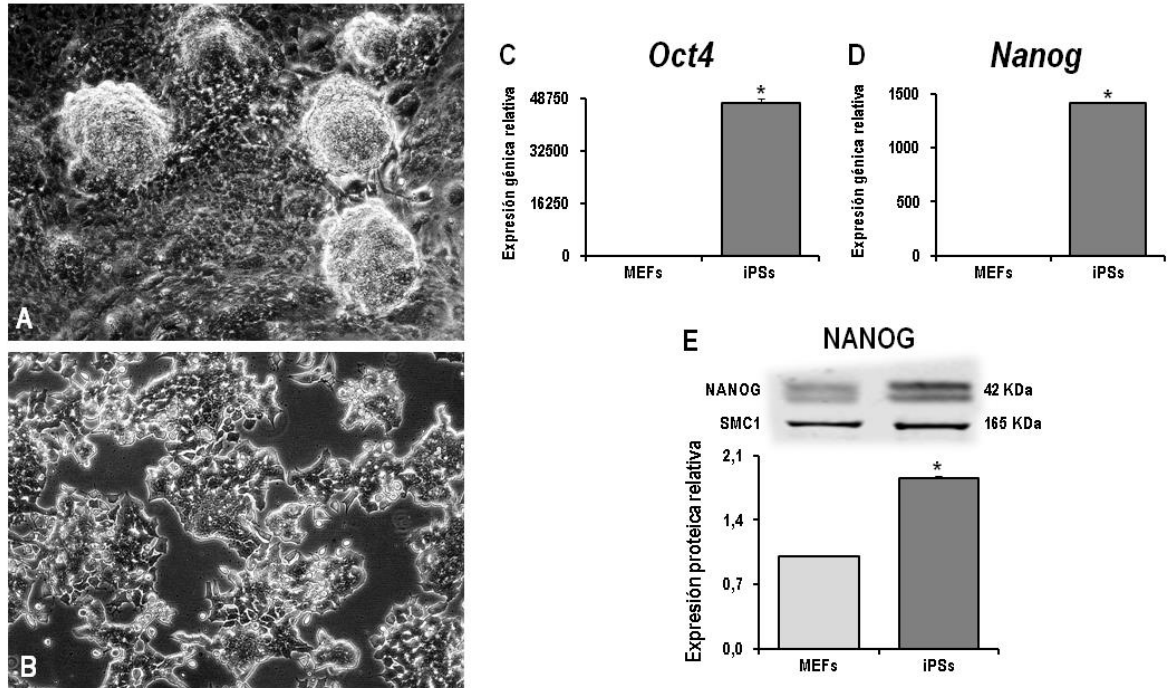


### 5.1.2 Evaluación de la eficiencia de generación de iPSC por PCR en tiempo real y western blot

Después de la infección de las células MEFs y después de 16 días de suplementación del sistema de cultivo celular reprogramador con el medio de cultivo específico, se produjo la formación de células iPSCs. Estas células mostraron características muy específicas, como el agrupamiento y disposición en una estructura vertical y tridimensional (colonias), la refringencia de colonias y la expresión de marcadores específicos, como se muestra en la figura 3.

En cuanto a la evaluación de la expresión génica relativa, fue observado que hubo un aumento en la expresión de *Oct4* y *Nanog* en las células iPSCs generadas en comparación con las células MEFs utilizadas para la reprogramación y que no fueron transfectadas con la construcción retroviral ( $p < 0.01$  para ambos los genes). Asimismo, de la misma manera, hubo un aumento en la expresión relativa de la proteína NANOG ( $p < 0.01$ ) para este mismo grupo, demostrando que hubo eficiencia en el proceso de reprogramación celular propuesto.

**Figura 3:** Eficiencia de la generación in vitro de iPSCs a partir de MEFs. **A)** Representación microscópica de la morfología característica de las colonias de iPSCs generadas en cultivo sobre feeders (x4) y **B)** tras ser recolectadas a los 16 días en cultivo sobre gelatina (x10). **C)** Representación gráfica de la expresión del gene *Oct4*, **D)** *Nanog* y **E)** expresión de la proteína NANOG. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , prueba t para muestras independientes).

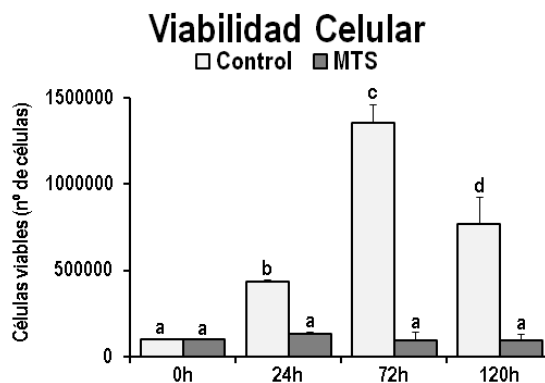


## 5.2 Diferenciación de iPSs en osteoblastos y la evaluación del potencial osteogénico

### 5.2.1 Viabilidad celular

A las 24, 72 y 120 horas, la viabilidad celular fue mayor en las iPSs cultivadas en medio no osteogénico en comparación con las iPSs cultivadas en medio osteogénico – MTS ( $p < 0.01$  para todos los períodos), con un aumento en el número total de células en el mismo período en 72 horas en comparación con los demás períodos evaluados, así como en 120 horas en comparación con 0 y 24 horas de cultivo ( $p < 0.01$  para todos los períodos). En cuanto a las células iPSs cultivadas en el MTS, no hubo diferencias estadísticamente significativas en su viabilidad al compararlas en los diferentes periodos evaluados ( $p > 0.05$  para todos los periodos).

**Figura 4:** Viabilidad celular de iPSs cultivadas en medio osteogénico (MTS) y no osteogénico (control) de 0 a 120h. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan de dos en dos ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA One-Way seguido de la prueba de Dunn).



### 5.2.1 Expresión génica y proteica de marcadores osteoblásticos mediante PCR en tiempo real y western blot

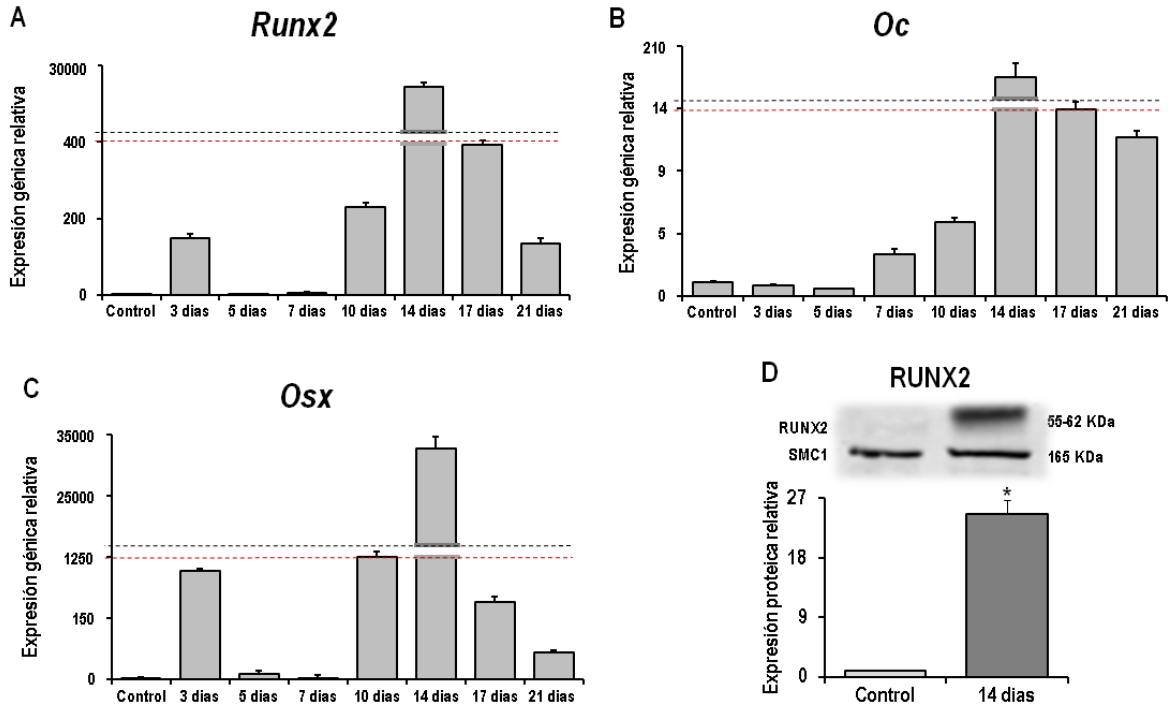
Para el gene *Runx2*, hubo un aumento en la expresión génica relativa de las iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 3, 10, 14, 17 y 21 días en comparación con las iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.005$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  y  $p = 0.047$  respectivamente). Además, hubo un aumento en la expresión a los 10 días en este mismo grupo en comparación con 5 días ( $p = 0.019$ ), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$  para todos los períodos), 17 días en comparación con 5 y 7 días ( $p = 0.005$  y  $p = 0.019$ , respectivamente) y 21 días en comparación con 5 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.012$ ), como se muestra en la Figura 5A y el Apéndice 1.

Para el gene *Oc*, hubo un aumento en la expresión génica relativa de las iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 7, 10, 14, 17 y 21 días en comparación con las iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.039$ ,  $p = 0.041$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.048$  y  $p = 0.013$  respectivamente). Además, para este mismo grupo, hubo un aumento en la expresión a los 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$  para todos los períodos), a los 17 días en comparación con los días 3, 5, 7 y 10 ( $p = 0.042$ ,  $p = 0.038$ ,  $p = 0.013$  y  $p = 0.036$  respectivamente) y 21 días en comparación con 3, 5, 7 y 10 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.011$ ,  $p = 0.010$ ,  $p = 0.032$  y  $p = 0.048$  respectivamente), como se muestra en la figura 5B y el Apéndice 1.

Para el gene *Osx*, hubo un aumento en la expresión génica relativa de las iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 3, 10, 14 y 17 días en comparación con las iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.005$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  y  $p = 0.019$  respectivamente). Además, para este mismo grupo hubo un aumento en la expresión a los 3 días en comparación con los 5 y 7 días ( $p = 0.040$  y  $p = 0.019$ , respectivamente), a los 10 días en comparación con los 5, 7 y 21 días ( $p = 0.030$ ,  $p = 0.019$  y  $p = 0.049$ , respectivamente), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p = 0.014$ ,  $p = 0.005$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.030$ ,  $p = 0.040$  y  $p = 0.019$ , respectivamente), 17 días al comparar a los 5, 7 y 21 días ( $p = 0.014$ ,  $p = 0.040$  y  $p = 0.037$ , respectivamente) y a los 21 días al comparar con 5 y 7 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.032$  y  $p = 0.014$ , respectivamente), como se demuestra en la Figura 5C y el Apéndice 1.

En cuanto a la expresión relativa de la proteína RUNX2, en 14 días hubo un aumento en la expresión de esta proteína en el grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico en comparación con las iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p < 0.001$ ), como se muestra en la figura 5D.

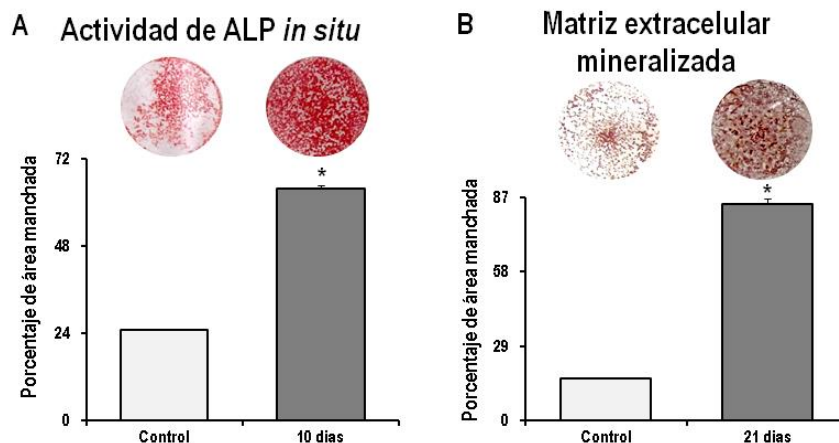
**Figura 5:** Representación gráfica de la expresión génica relativa de marcadores osteoblásticos **A) *Runx2***, **B) *Oc***, **C) *Osx*** y **D)** expresión proteica de RUNX2 en iPSs cultivadas en medio osteogénico y no osteogénico en diferentes momentos. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , prueba t independiente).



### 5.2.3 Actividad de la fosfatasa alcalina *in situ* y formación de matriz extracelular mineralizada

A los 10 y 21 días, la actividad de ALP *in situ* y la mineralización de la matriz extracelular, respectivamente, fueron mayores en las iPSs cultivadas en medio de diferenciación osteogénica en comparación con las células iPSs no sometidas al proceso de diferenciación ( $p < 0.01$  para ambas), como se muestra en las figuras 6A e 6B.

**Figura 6:** **A)** Actividad ALP *in situ* a los 10 días y **B)** Mineralización de la matriz extracelular a los 21 días en iPSs cultivadas en medio osteogénico y no osteogénico. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ , prueba t independiente).



### 5.3 Perfil de expresión génica asociada a telómeros y telomerasa durante la diferenciación osteoblástica

Para el gene *Trf1*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p < 0.004$  para todos los períodos) y iPSs que fueron reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico ( $p < 0.001$  para todos los períodos). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene en 3 días en comparación con 7, 10, 14, 17 y 21 días ( $p < 0.001$  para todos los períodos), 5 días en comparación con 3, 7, 10, 14, 17 y 21 días ( $p < 0.001$  para todos los períodos), 10 días en comparación con 7, 17 y 21 días ( $p < 0.001$  para todos los períodos), 14 días en comparación con 17 y 21 días ( $p < 0.001$  para todos los períodos) y 21 días en comparación con 17 días en medio osteogénico ( $p = 0.002$ ). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, se observó un aumento en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.010$ ), como se muestra en la Figura 7A y el Apéndice 2.

Para el gene *Trf2*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 10, 14, 17 y 21 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.012$ ,  $p = 0.003$ ,  $p = 0.019$  y  $p = 0.036$ , respectivamente) e iPSs que fueron reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico a los 10 y 14 días ( $p = 0.048$ ,  $p = 0.025$ , respectivamente). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene en 10 días en comparación con 3, 5 y 7 días ( $p = 0.003$ ,  $p < 0.001$  y  $p = 0.045$ , respectivamente), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.015$ ,  $p = 0.032$ ,  $p = 0.048$  y  $p = 0.017$ , respectivamente), 17 días en comparación con 3 y 5 días ( $p = 0,040$ ,  $p = 0,013$ , respectivamente) y 21 días en comparación con 3 y 5 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0,010$  y  $p = 0,003$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, no se observó diferencia estadística en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p > 0.050$ ), como se muestra en la Figura 7B y el Apéndice 2.

Para el gene *Rap1*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 7, 10 y 21 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.049$ ,  $p = 0.012$  y  $p = 0.031$ , respectivamente) e iPSs que se

reprogramaron y crecieron en medio no osteogénico ( $p = 0.023$ ,  $p = 0.042$  y  $p = 0.025$ , respectivamente). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene a los 7 días en comparación con los días 3, 5, 14 y 17 ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.005$ ,  $p = 0.041$  y  $p = 0.022$ , respectivamente), 10 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.025$ ,  $p = 0.022$ ,  $p = 0.004$  y  $p = 0.023$ , respectivamente), 14 y 17 días en comparación con 3 días ( $p = 0.045$  y  $p = 0.015$ , respectivamente) y 21 días en comparación con 3, 5, 14 y 17 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.006$ ,  $p = 0.009$  y  $p = 0.025$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, se observó un aumento en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.019$ ), como se muestra en la Figura 7C y el Apéndice 2.

Para el gene *Tin2*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 7, 10, 14 y 21 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$  y  $p = 0.007$ , respectivamente) e iPSs que se reprogramaron y crecieron en medio no osteogénico a los 10, 14 y 21 días ( $p = 0.045$ ,  $p = 0.013$  y  $p = 0.041$ , respectivamente). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene en 7 días en comparación con 3 días ( $p = 0.013$ ), 10 días en comparación con 3, 5 y 17 días ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.017$  y  $p = 0.049$ , respectivamente), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$ ,  $p = 0.042$ ,  $p = 0.030$ ,  $p = 0.017$  y  $p = 0.019$ , respectivamente) y 21 días con 3, 5 y 17 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.040$  y  $p = 0.010$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, no se observó diferencia estadística en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p > 0.050$ ), como se muestra en la Figura 7D y Apéndice 2.

Para el gene *Pot1a*, hubo una disminución en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico en 3 y 5 días ( $p = 0.019$  y  $p = 0.047$ , respectivamente) y un aumento en la expresión en 10 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.049$ ). Aún así, para este mismo grupo, hubo una disminución en la expresión génica relativa a los 3, 5 y 17 días ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.012$  y  $p = 0.036$ , respectivamente) y un aumento en la expresión a los 10 días en comparación con las iPSs que fueron reprogramados y cultivados en medio no osteogénico ( $p = 0.016$ ). Además, se observó un aumento en la expresión de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 7 días en comparación con los 3 y 5

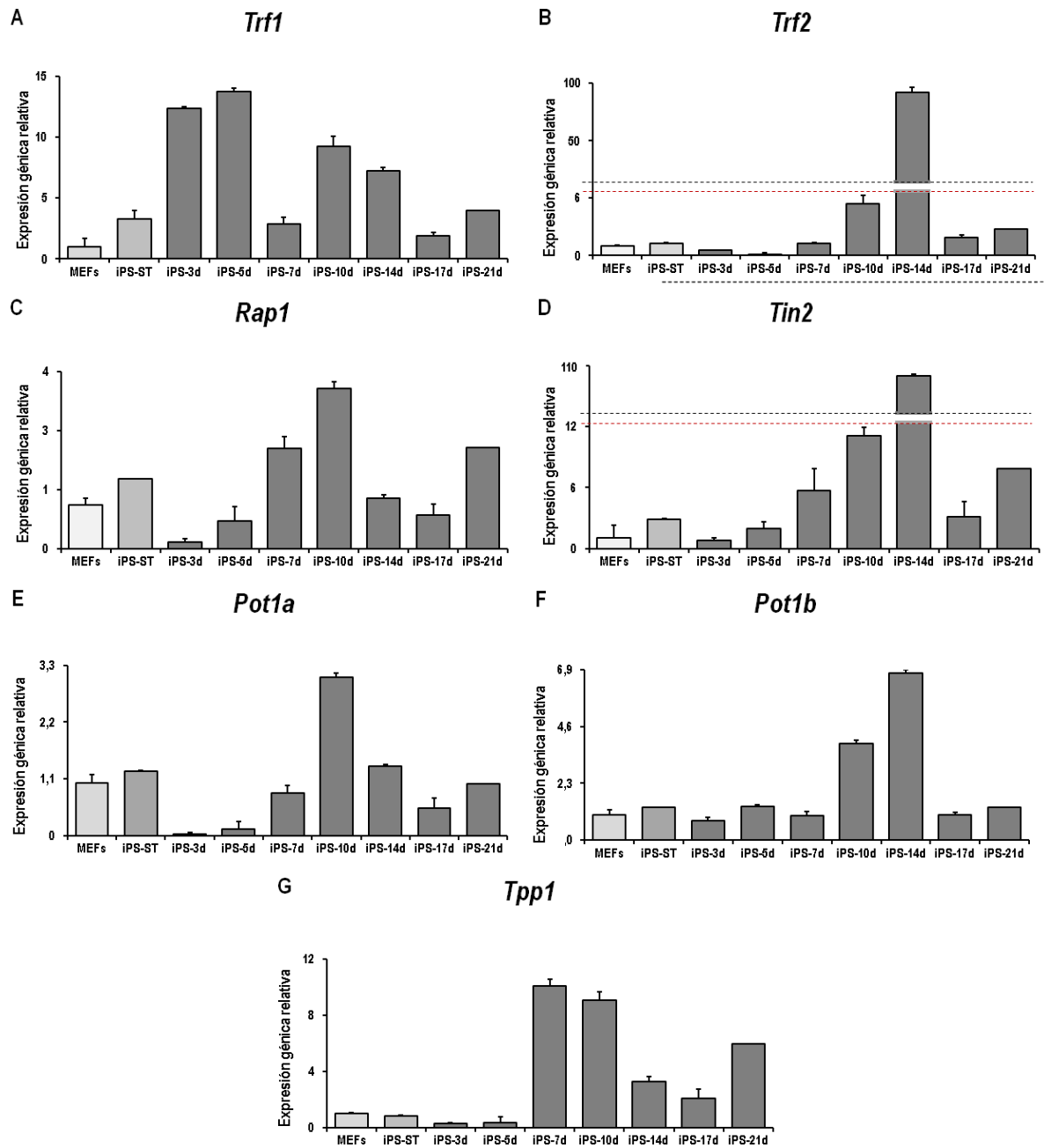
días ( $p = 0.049$  y  $p = 0.011$ , respectivamente), a los 10 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.020$ ,  $p = 0.025$ ,  $p = 0.003$  y  $p = 0.043$ , respectivamente), 14 días frente a 3 y 5 días ( $p = 0.001$  y  $p = 0.005$ , respectivamente) y 21 días frente a 3 y 5 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.019$  y  $p = 0.049$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, no se observó diferencia estadística en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p > 0.050$ ), como se muestra en la Figura 7E y el Apéndice 2.

Para el gene *Pot1b*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 10 y 14 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.017$  y  $p = 0.005$ , respectivamente) y un aumento en la expresión en estos mismos períodos en iPSs que fueron reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.011$  y  $p = 0.049$ , respectivamente). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene para todos los períodos evaluados en comparación con los 10 días ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.010$ ,  $p = 0.032$ ,  $p = 0.013$  y  $p = 0.016$ , respectivamente) y 14 días de cultivo en medio osteogénico ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.022$ ,  $p = 0.003$ ,  $p = 0.032$ ,  $p = 0.004$  y  $p = 0.035$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, no se observó diferencia estadística en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p > 0,050$ ), como se muestra en la Figura 7F y el Apéndice 2.

Para el gene *Tpp1*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 7, 10, 14, 17 y 21 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.008$ ,  $p = 0.025$ ,  $p = 0.015$ ,  $p = 0.048$  y  $p = 0.049$ , respectivamente) y un aumento de la expresión en estos mismos períodos en iPSs reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0.004$ ,  $p = 0.013$ ,  $p = 0.049$ ,  $p = 0.020$  y  $p = 0.040$ , respectivamente). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene a los 7 días en comparación con los días 3, 5, 14, 17 y 21 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.042$ ,  $p = 0.032$  y  $p = 0.017$ , respectivamente), 10 días en comparación con 3, 5, 14, 17 y 21 días ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.018$ ,  $p = 0.042$  y  $p = 0.032$ , respectivamente) y 21 días en comparación con 3, 5, 14 y 17 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.009$ ,  $p = 0.032$  y  $p = 0.019$ , respectivamente). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, no se observó

diferencia estadística en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPS cultivadas en medio no osteogénico ( $p > 0.050$ ), como se muestra en la Figura 7G y Apéndice 2.

**Figura 7:** Representación gráfica de la expresión génica relativa de los componentes del complejo Shelterin **A) *Trf1***, **B) *Trf2***, **C) *Rap1***, **D) *Tin2***, **E) *Pot1a***, **F) *Pot1b*** y **G) *Tpp1*** en MEFs e iPS cultivadas en medio osteogénico y no osteogénico.



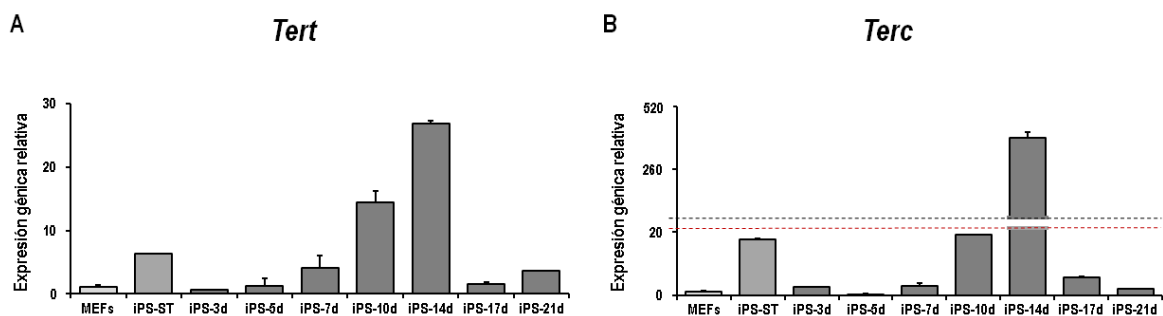
Para el gene *Tert*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 10 y 14 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p < 0.001$  para ambos períodos) y un aumento en la expresión en estos



mismos períodos en iPSs que fueron reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico ( $p < 0.001$  para ambos periodos). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene en 7 días en comparación con 3, 5 y 17 días ( $p = 0.009$ ,  $p = 0.044$  y  $p = 0.049$ , respectivamente), 10 días en comparación con 3, 5, 7, 17 y 21 días ( $p < 0.001$  para todos los períodos), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$  para todos los períodos) y 21 días en comparación con 3 días de cultivo en medio osteogénico ( $p = 0.028$ ). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, se observó un aumento en la expresión de este gene tras la reprogramación en células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p < 0.001$ ), como se muestra en la Figura 8A y el Apéndice 2.

Para el gene *Terc*, hubo un aumento en la expresión relativa de iPSs cultivadas en medio osteogénico a los 10 y 14 días cuando comparado a las células MEFs utilizadas para la reprogramación de iPSs ( $p = 0.003$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) y un aumento en la expresión a 14 días en iPSs reprogramadas y cultivadas en medio no osteogénico ( $p < 0.001$ ). Además, para este mismo grupo de iPSs cultivadas en medio osteogénico, hubo un aumento en la expresión de este gene en 10 días en comparación con 3, 5, 7, 17 y 21 días ( $p = 0.007$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.007$ ,  $p = 0.031$  y  $p = 0.004$ ), 14 días en comparación con todos los períodos evaluados ( $p < 0.001$  para todos los períodos) y una disminución en la expresión a los 21 días en comparación con las iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0,010$ ). Comparando la expresión de este gene entre los MEFs utilizados en la reprogramación y las iPSs reprogramadas cultivadas en medio no osteogénico, se observó un aumento en la expresión de este gene tras la reprogramación en las células iPSs cultivadas en medio no osteogénico ( $p = 0,006$ ), como se muestra en la Figura 8B y el Apéndice 2.

**Figura 8:** Representación gráfica de la expresión génica relativa de los componentes del complejo de la telomerasa A) *Tert* y B) *Terc* en MEFs e iPSs cultivados en medio osteogénico y no osteogénico.



## 6 DISCUSIÓN

El establecimiento de la identidad celular en organismos multicelulares se ha estudiado clásicamente en el contexto del desarrollo embrionario (Chen et al., 2021; Hayes y Melrose, 2020). Cada célula se caracteriza por tener la capacidad de diferenciarse, o sea, es decir sobre la capacidad de especializarse para realizar una determinada función en función de los diferentes tipos de regulación génica (Lau et al., 2022). Además, también tienen como característica importante la plasticidad, la capacidad celular de sufrir cambios fenotípicos que reflejan cambios en su identidad, que pueden ser transitorios (en respuesta al daño) o no transitorios (de manera que las células no se recuperen completamente). Las células madre juegan un papel clave en los procesos de plasticidad (Lau et al., 2022; Spatz, Jin and Mills, 2021). En eso, el descubrimiento de métodos para reprogramar células somáticas en iPSs abrió un nuevo capítulo en el estudio de la diferenciación y plasticidad celular, con el fin de explorar nuevas estrategias genómicas y herramientas mejoradas para identificar las redes biofuncionales involucradas en la generación, mantenimiento, perturbación y identidad (Guan et al., 2022).

Las MSCs obtenidas de roedores adultos se han utilizado en modelos de reparación de tejidos bien establecidos en la literatura; sin embargo; su disponibilidad y plasticidad son limitadas (Lessa et al., 2012). Por otro lado, las células pluripotentes tienen una alta capacidad de autorrenovación e inmunocompatibilidad y las iPSs, por ser generadas a partir de cualquier tipo de célula del organismo, son prometedoras para diversas terapias, con menos desafíos éticos en comparación con las células madre embrionarias o las propias MSCs (Mandai et al., 2017; Picanço-Castro et al., 2011; Takahashi y Yamanaka, 2006).

Entre los tipos de células madre conocidas, se sabe que las células madre embrionarias (ES) tienen una alta plasticidad y un gran potencial de autorrenovación, lo que aumenta su capacidad de diferenciarse en células de todos los tejidos corporales, excepto los anexos embrionarios; lo que las convierte en una herramienta de gran interés en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular. Sin embargo, su uso aún es bastante limitado debido a reacciones inmunológicas, además de aspectos éticos y religiosos. Así, en este campo se han llevado a cabo diferentes estudios en un intento de optimizar terapéuticamente el uso de las células, uno de ellos es la reprogramación de células somáticas en iPSs (Gomes et al., 2017; Mandai et al., 2017; Marión y Blasco, 2010). Este proceso de reprogramación fue desarrollado por el grupo del investigador Dr. Shinya Yamanaka, quien indujo pluripotencia en fibroblastos de ratón a partir de la expresión de cuatro factores de transcripción *Oct3/4* (también conocido como *Pou5f1*), *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, ahora conocidos como factores de Yamanaka (Takahashi

et al., 2006). Así, con la reprogramación celular realizada, las células generadas se conocieron como “células pluripotentes inducidas” o simplemente iPSs (Patel y Yang, 2010; Nakagawa et al., 2008;). Las iPSs se denominaron así porque son muy similares a las células ES en varios aspectos, incluido el patrón de expresión génica y epigenética y el proceso de diferenciación celular. Este método de derivación de células del donante presenta ventajas frente a las células embrionarias, como un menor riesgo de rechazo por parte del sistema inmunitario y la minimización de conflictos éticos y religiosos, abriendo grandes perspectivas en el mundo de la ciencia (Gomes et al., 2017; Johnson y Cohen, 2012). Siguiendo esta idea, esto justifica el hecho de que utilizamos este modelo celular para evaluar el potencial osteogénico en nuestro estudio, ya que se presenta como una herramienta potencial para su uso en el campo de la medicina regenerativa del tejido óseo.

Al pasar los años, la mejora de las técnicas de reprogramación así como la selección de células reprogramadas permitió derivar células iPSs capaces de contribuir a las tres capas germinales, acercándolas al potencial de desarrollo de las células ES (Villodre, 2016; Nichols y Smith , 2012). Muchas líneas de células iPSs humanas y de ratón inducidas por la sobreexpresión de factores de Yamanaka se han caracterizado ampliamente a nivel molecular y son similares a las células ES en su expresión y firmas de cromatina (Delgado-Olguín y Recillas-Targa, 2011). Por lo tanto, la reprogramación conduce al silenciamiento de los genes expresados somáticamente y la regulación al alza de los genes de las células ES, concomitante con la redefinición de la estructura de la cromatina. Estos factores de transcripción son importantes para el establecimiento y/o mantenimiento del estado pluripotente durante el desarrollo embrionario temprano (Gafni et al., 2013; Shafa et al., 2010).

Es importante tener en cuenta que los factores de Yamanaka mantienen el estado pluripotente y de autorrenovación de las células ES al ocupar conjuntamente las regiones promotoras y potenciadoras de un gran conjunto de genes específicos de células ES altamente expresados, a menudo denominados genes de pluripotencia. La co-ocupación de *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* predice la co-ocupación de *Nanog*, otro factor de transcripción específico para las células ES (Villodre, 2016; Wei et al., 2009; Chew et al., 2005). Por lo tanto, se ha sugerido que *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* cooperan en el curso de la reprogramación para establecer entornos funcionales necesarios para la regulación positiva del transcriptoma específico de células ES. Por el contrario, la unión solitaria de estos factores en las células ES generalmente se asocia con la represión transcripcional y esto puede explicar cómo *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* pueden silenciar la expresión génica somática al inicio de la reprogramación (Xiong et al., 2022; Friman et al., 2019). El *c-Myc*, un conocido oncogén y regulador del ciclo celular, tiene un conjunto muy

distinto de genes que se dirigen a *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* en las células ES. Aunque que *c-Myc* puede ocupar conjuntamente algunos genes diana como *Oct4*, *Sox2* y *Klf4*, se cree que estos factores de transcripción constituyen dos redes de transcripción en gran parte separadas en las células ES. Curiosamente, el *c-Myc* ectópico es prescindible para la creación de células iPSs, pero, actúa como un potenciador cinético y una eficiencia de reprogramación, lo que respalda la idea de que la activación del gene de pluripotencia no depende directamente de *c-Myc* (Lu et al., 2020; Villodre, 2016). Así, en nuestro estudio, optamos por usar solo los factores *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* y tuvimos éxito en el proceso de reprogramación de las MEFs, como se demuestra en los resultados presentados.

Cuando hablamos de iPSs, no podemos dejar de mencionar una de sus principales características: su capacidad de proliferación, donde su autorrenovación se produce a través de un ciclo celular con una fase G1 acortada y una regulación positiva y acelerada de genes que codifican histonas – las proteínas que apoyan la replicación del ADN (Sansurjo-Rodríguez et al., 2020); Medina et al., 2012). Pensando en esta característica, durante nuestro estudio, notamos que después de iniciar el cultivo celular de iPSs reprogramadas con medio de diferenciación osteoblástica (10% de medio de cultivo DMEM asociado con ácido ascórbico, beta-glicerol fosfato y dexametasona), hubo una disminución en la viabilidad celular (número de células totales) en comparación con las células iPSs que no estaban en cultivo con medio de diferenciación osteogénica. En este sentido, la literatura científica han demostrado que los glucocorticoides como la dexametasona, una vez utilizados durante un tiempo prolongado, pueden conducir a una apoptosis acelerada debido a su citotoxicidad inducida y a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que aceleran la senescencia celular de las iPSs (Lou , 2015; Peltz et al., 2012; Kao et al., 2010). A pesar de haberse producido la disminución de la viabilidad celular de las células en el grupo de iPSs en proceso de diferenciación osteoblástica, entendemos que esto no influyó negativamente en los resultados encontrados, ya que conseguimos la diferenciación completa de las OBs en 21 días de cultivo. Sin embargo, como una forma de eludir esta condición, al buscar en la literatura, los autores sugieren medidas alternativas como el uso de Resveratrol agregado al proceso de diferenciación osteoblástica, un polifenol natural que se encuentra en abundancia en la piel de frutas como la uva, ya que este componente tiene capacidad antiinflamatoria y protectora contra la apoptosis celular (Lou, 2015; Peltz et al., 2012; Kao et al., 2010; Zhao et al., 2008; Backesjo et al., 2006; Kundu y Surh, 2004).

En cuanto al uso de las iPSs en el campo de la medicina regenerativa con vistas a la reparación ósea, se sabe que aún está poco explorado. Egusa et al., (2014) al estudiar la

capacidad de diferenciar iPSs en OBs, observaron la formación de nódulos de mineralización robustos que contenían fosfato de calcio y cristales de hidroxiapatita. Asimismo, Baird et al., (2018), al estudiar in vitro el uso de iPSs como posible herramienta en la reparación del tejido óseo en caballos, demuestran que estas células mantenidas en un medio de cultivo osteogénico eran capaces de regular positivamente la expresión de varios objetivos osteoblásticos, entre ellos los genes *Col1A1*, *Sparc*, *Spp1*, *Ibsp*, *Runx2* y *Bgalpt*, además de producir matriz mineralizada y aumentar la actividad de ALP. En este sentido, los hallazgos en la literatura están en línea con los datos obtenidos por el presente estudio, ya que, al someter nuestras iPSs reprogramadas a partir de MEFs de ratones en cultivo con medio de diferenciación osteogénica, se percibió un efecto estadísticamente significativo tanto en el genotipo como en el esferas fenotípicas en OBs inducidas por diferenciación físico-química, comprobando nuestra hipótesis y demostrando que estas células tienen un gran potencial osteogénico para su uso en terapia celular y medicina regenerativa del tejido óseo. La diferenciación osteoblástica es un proceso complejo que involucra la regulación precisa de la activación y supresión de varios genes en respuesta a señales fisiológicas y, a nivel bioquímico, la vía principal involucra la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP)-Smad, que conduce a la activación de genes esenciales en OBs, como los genes *Runx2*, *Oc* y *Osx* evaluados en este estudio (Okamoto et al., 2012; Liu et al., 2015; Suzuki et al., 2006).

El uso exitoso de células reprogramadas requiere mantener la estabilidad genómica y la supervivencia celular para garantizar la función a largo plazo y garantizar su diferenciación en otros tipos de células (Kercher, 2014). Los mecanismos subyacentes a la reprogramación aún no están claros, pero se cree que implican cambios en todo el genoma en la estructura de la cromatina y la expresión génica (Ronen y Benvenesty, 2012). En este sentido, una adecuada función de los telómeros es fundamental para garantizar la estabilidad cromosómica de las células reprogramadas resultantes. La replicación incompleta del ADN de los telómeros lleva como resultado un acortamiento progresivo de los telómeros, lo que eventualmente puede provocar el desacoplamiento de los telómeros y la detención/senescencia del ciclo celular. Además, el acortamiento progresivo de los telómeros se propone como uno de los mecanismos subyacentes al envejecimiento del organismo y la aparición de enfermedades. La longitud de los telómeros se mantiene gracias a la telomerasa, una transcriptasa codificada por los genes *Tert* (telomerasa transcriptasa inversa) y *Terc* (componente de ARN de la telomerasa), que agrega nuevas repeticiones en los telómeros después de cada ronda de división celular (Blasco et al., 2011). En este sentido, Marion et al., (2009) demostró que existe una elongación drástica dependiente de la telomerasa en células iPSs derivadas de MEFs como las utilizadas en nuestro

estudio, en cual el proceso continúa tras la reprogramación hasta alcanzar la longitud telomérica de las células ES. Incluso, mismo cuando se usaron fibroblastos viejos como células donantes, que mostraron telómeros mucho más cortos que los MEFs, los telómeros se alargaron de manera eficiente en las células iPSs resultantes. Estos resultados sugieren que las células iPSs derivadas de donantes con una reserva limitada de telómeros, como personas de edad avanzada o pacientes con enfermedades caracterizadas por telómeros cortos por ejemplo, rejuvenecerán sus telómeros, siempre que porten un gen de telomerasa funcional (Marion y Blasco, 2010).

Esta información es muy importante cuando pensamos en la diferenciación osteoblástica de iPSs reprogramadas, ya que nuestros datos muestran un impacto directo en los cambios en las expresiones génicas de los componentes del complejo Shelterin asociados con el telómero, así como los componentes de la telomerasa desde el momento en que empezamos a hacer el proceso de diferenciación celular. Se sugiere un estudio más profundo sobre este tema, principalmente en la evaluación de la longitud de los telómeros durante este proceso y la asociación con los transcritos en ARN largos no codificantes (*Telomeric Repeat-Containing RNA - Terra*), dada su asociación directa con la longitud de los telómeros y expresión del gene *Trf2*; donde los autores citan que su actividad puede estar relacionada con la regulación epigenética en la generación de iPSs, dando lugar a una conformación de la cromatina más abierta con una menor densidad de marcas de histonas heterocromáticas, lo que coincide con un aumento de la transcripción de los telómeros, un aumento de la recombinación de los telómeros y una elongación continua de los telómeros hasta alcanzar la longitud de los telómeros de las células ES (Marion y Blasco, 2010; Caslini et al., 2009; Benetti et al., 2008). Una vez que hay un desequilibrio en la expresión de *Trf2* y *Terra*, puede haber una acumulación de daño en el ADN en los telómeros, incluida una disminución en el tamaño de los telómeros (Zanelatto, 2017). En este sentido, dado que observamos una mayor alteración en la expresión génica de los marcadores evaluados a los 14 días, durante el periodo en el que las células ya están totalmente comprometidas con la diferenciación osteoblástica, se plantea la hipótesis de que en ese momento las células ya pueden estar teniendo una alteración considerable aumento de la longitud de sus telómeros. Este conocimiento y comprensión del perfil de expresión de los componentes asociados a los telómeros y la telomerasa durante el proceso de diferenciación de IPSs a OBs, como los evaluados en este estudio, son necesarios para una comprensión más detallada del mecanismo biológico que aún no ha sido elucidado, ya que este puede ser la clave del éxito en el desarrollo de varios tratamientos clínicos, incluidas varias enfermedades que afectan el tejido óseo.

## 7 CONCLUSIÓN

Al someter las iPSS reprogramadas de MEFs en cultivo con medio de diferenciación osteogénica, se notó un efecto estadísticamente significativo tanto en el ámbito genotípico como fenotípico en las OBs inducidas por diferenciación físico-química, donde, hubo un aumento en la expresión génica y proteica de marcadores osteoblásticos importantes en este proceso además de un aumento de la actividad fenotípica de ALP in situ y mineralización de la matriz extracelular de OBs obtenidas a partir de iPSS. Además, nos dimos cuenta de que esta inducción físico-química para la diferenciación es capaz de conducir a alteraciones considerables de los marcadores genéticos de los componentes del complejo Shelterin de los telómeros y componentes de la telomerasa, lo que puede influir en los patrones epigenéticos y el éxito de la diferenciación osteoblástica de las iPSS.

Así, a través de este estudio pudimos probar nuestra hipótesis y demostrar que estas células tienen un gran potencial osteogénico para su uso en terapia celular y medicina regenerativa dirigida a enfermedades del tejido óseo.

## 8 REFERENCIAS

- BACKESJO, C.M. *et al.* Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res.**, 21:993–1002, 2006.
- BAIRD, A. *et al.* Osteoblast differentiation of equine induced pluripotent stem cells. **Biol Open.**, 7:bio033514, 2018.
- BENETTI, R. *et al.* Role of Trf2 in the assembly of telomeric chromatin. **Cell Cycle**, 7(21): 3461–8, 2008.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, 2:313-319, 2008.
- BLASCO, M.A.; SERRANO, M.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. Genomic instability in iPS: time for a break. **EMBO J**, 30(6):991-3., 2011.
- BLELLOCH, R. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. **Cell Stem Cell**, 245–247, 2007.
- BRYDONE, A.S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proc Inst Mech Eng H**, 224:1329-1343, 2010.
- CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells and women's health. **Menopause**, 22:131-135, 2015.
- CASLINI, C. *et al.* MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. **Molecular and cellular biology**, 29(16): 4519–26, 2009.

CHEN, K. *et al.* Branching development of early post-implantation human embryonic-like tissues in 3D stem cell culture. **Biomaterials**, 275:120898, 2021.

CHEW, J.L. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. **Mol Cell Biol.**, 25(14):6031-46, 2005.

DELGADO-OLGUÍN, P.; RECILLAS-TARGA, F. Chromatin structure of pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cells. **Brief Funct Genomics**, 10(1):37-49, 2011.

EGUSA, H. *et al.* Comparative analysis of mouse-induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro. **Stem Cells Dev.**, 23:2156-69, 2014.

FERRAZ, E.P. *et al.* Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (bios-2p) for bone tissue engineering. **Biomed Mater.**, 12:045018, 2017.

FREITAS, G.P. *et 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.**, 101:312-320, 2017.

FREITAS, G.P. *et al.* Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. **Regen Med.**, 12:1107-1119, 2019a.

FREITAS, G.P. *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.**, 9:13476, 2019b.

FRIMAN, E.T. *et al.* Dynamic regulation of chromatin accessibility by pluripotency transcription factors across the cell cycle. **Elife.**, 8:e50087, 2019.

GAFNI, O. *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. **Nature**, 504(7479):282-6, 2013.

GOMES, K.M.S. *et al.* Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. **Rev Assoc Med Bras.**, 63:180-189, 2017.

GUAN, J. *et al.* Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. **Nature**, 605(7909):325-331, 2022.

HAYES, A.J.; MELROSE, J. Aggrecan, the primary weight-bearing cartilage proteoglycan, has context-dependent, cell-directive properties in embryonic development and neurogenesis: aggrecan glycan side chain modifications convey interactive biodiversity. **Biomolecules**, 10(9):1244, 2020.

JOHNSON, M.H.; COHEN, J. Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka. **Reprod Biomed Online**, 25:549-50, 2012.



- KAO, C.L. *et al.* Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev.**, 19(2):247-58, 2010.
- KERCHER, D.L. Identificação da expressão das variantes 1 e 2 do gene que codifica a fosfatase alcalina em células tronco derivadas de tecido adiposo induzidas com dexametasona. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, 2014.
- KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. **Mutat Res.**, 555:65–80, 2004.
- KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. **Cancer Lett.**, 269:243–261, 2008.
- LAU, K.Y.C. *et al.* Mouse embryo model derived exclusively from embryonic stem cells undergoes neurulation and heart development. **Cell Stem Cell**, 29(10):1445-1458, 2022.
- LESSA, T.B. *et al.* Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice. **Acta Vet Scand.**, 54:73, 2012.
- LIU, T. *et al.* Epigenetic silencing of HDAC1 by miR-449a upregulates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. **Int J Mol Med.**, 35:238-246, 2015.
- LU, Y. *et al.* Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. **Nature**, 588(7836):124-129, 2020.
- MACHADO, LS. *et al.* Induced pluripotent stem cells (iPS cells) in domestic animals and the possibility to generate gametes in vitro. **Rev Bras Reprod Anim.**, 42:114-119, 2018.
- MAJORS, A.K. *et al.* Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. **J Orthop Res.**, 15:546-57, 1997.
- MANDAI, M. *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. **N Engl J Med.**, 376:1038-1046, 2017.
- MARIÓN, R.M.; SCHOTTA, G.; ORTEGA, S.; BLASCO, M.A. Suv4-20h Abrogation increases telomere elongation during reprogramming and confers superior tumorigenic potential to iPS cells. **PLoS One**, 6:e25680, 2011.
- MARIÓN, R.; BLASCO, M.A. Telomere rejuvenation during nuclear reprogramming. **Curr Opin Genet Dev.**, 20:190–196, 2010.
- MARIÓN, R.M. *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, 4:141–154, 2009.
- MESHORER, E. *et al.* Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. **Dev Cell**, 10:105-116, 2006.

- NAKAGAWA, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nat Biotechnol.**, 26:101–106, 2008.
- NICHOLS, J.; SMITH, A. Pluripotency in the embryo and in culture. Cold Spring Harb Perspect **Biol.**, 4(8):a008128, 2012.
- OKAMOTO, H. *et al.* Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells. **PLoS One**, 7(8):e43800, 2012.
- PATEL, M.; YANG, S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Rev.**, 6:367-80, 2010.
- PICANÇO-CASTRO, V. *et al.* Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. **Stem Cells Dev.**, 20:169-80, 2011.
- RONEN, D.; BENVENISTY, N. Genomic stability in reprogramming. **Curr Opin Genet Dev.**, 22(5):444-449, 2012.
- RIVAS, M.P. Avaliação de marcadores da senescência celular replicativa em células tronco mesenquimais humanas. **Monografia para conclusão de curso.** Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal Da Bahia - UFBA, 2013.
- SANTOS, T.S. *et al.* Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. **Regen Med.**, 10:127-133, 2015a.
- SANTOS, T.S. *et al.* Mesenchymal stem cells repress osteoblast differentiation under osteogenic-inducing conditions. **J Cell Biochem.**, 116:2896-2902, 2015b.
- SARAFIAN, R. Monitoring cell line identity in collections of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, 28:66-70, 2018.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M.A. Regulation of chromatin and non-coding RNAs in mammalian telomeres. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 21:186–193, 2010.
- SHAFI, M.; KRAWETZ, R.; RANCOURT, D.E. Returning to the stem state: epigenetics of recapitulating pre-differentiation chromatin structure. **Bioessays**, 32(9):791-799, 2010.
- SOUZA, A.T.P. *et al.* Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. **Cytotherapy**, 20:1267-1277, 2018.
- SOUZA, A.T.P. *et al.* Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. **J Bone Miner Metab.**, 38(4): 481-490, 2020.
- SPATZ, L.B. *et al.* Cellular plasticity at the nexus of development and disease. **Development**, 148(3):197392, 2021.
- SUZUKI, A. *et al.* Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103(27):10294-10299, 2006.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 126:663-676, 2006.

VILLODRE, E.S. Importância dos fatores de Yamanaka e NANOG na resposta ao tratamento com cisplatina ou etoposídeo em células de teratocarcinoma P19. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2016.

WALMSLEY, G.G. *et al.* Stem cells in bone regeneration. **Stem Cell Rev Rep.**, 12:524-529, 2016.

WEI, Z. *et al.* Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. **Stem Cells**, 27(12):2969-78, 2009.

XIONG, L. *et al.* Oct4 differentially regulates chromatin opening and enhancer transcription in pluripotent stem cells. **Elife**, 11:e71533, 2022.

ZANELATTO, L.C. Perfil de expressão de TERRA (telomeric repeat-containing RNA) e sua correlação com o desequilíbrio telomérico em indivíduos com leucemia mielóide aguda (LMA). **Monografia de conclusão de curso de Especialização**. Programa de Pós-Graduação em Hematologia Clínica e Banco de Sangue, Academia de Ciência e Tecnologia – AC&T, 2017.

ZHAO, X.Y. *et al.* Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol.**, 154:105–113, 2008.

## APÉNDICE 1

**Tabla 4:** Comparaciones estadísticas de las expresiones relativas de *Runx2*, *Oc* y *Osx* en los diferentes tiempos evaluados.

| <i>Runx2</i> |                |  |             |                |  |             |                |
|--------------|----------------|--|-------------|----------------|--|-------------|----------------|
| Comparación  | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 2        | $p = 0.025^*$  |  | 3 y 5       | $p = 0.019^*$  |  | 6 y 5       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 5        | $p = 0.005^*$  |  | 6 y 1       | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 7       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 6        | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 2       | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 8       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 7        | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 3       | $p < 0.001^*$  |  | 8 y 3       | $p = 0.012^*$  |
| 1 y 8        | $p = 0.047^*$  |  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  |  | -           | -              |
| <i>Oc</i>    |                |  |             |                |  |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 4        | $p = 0.039^*$  |  | 6 y 3       | $p < 0.001^*$  |  | 7 y 4       | $p = 0.013^*$  |
| 1 y 5        | $p = 0.041^*$  |  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  |  | 7 y 5       | $p = 0.036^*$  |
| 1 y 6        | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 5       | $p < 0.001^*$  |  | 8 y 2       | $p = 0.011^*$  |
| 1 y 7        | $p = 0.048^*$  |  | 6 y 7       | $p < 0.001^*$  |  | 8 y 3       | $p = 0.010^*$  |
| 1 y 8        | $p = 0.013^*$  |  | 6 y 8       | $p < 0.001^*$  |  | 8 y 4       | $p = 0.032^*$  |
| 6 y 1        | $p < 0.001^*$  |  | 7 y 2       | $p = 0.042^*$  |  | 8 y 5       | $p = 0.048^*$  |
| 6 y 2        | $p < 0.001^*$  |  | 7 y 3       | $p = 0.038^*$  |  | -           | -              |
| <i>Osx</i>   |                |  |             |                |  |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |  | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 2        | $p = 0.005^*$  |  | 5 y 4       | $p = 0.019^*$  |  | 6 y 8       | $p = 0.019^*$  |
| 1 y 5        | $p < 0.001^*$  |  | 5 y 8       | $p = 0.049^*$  |  | 7 y 3       | $p = 0.014^*$  |
| 1 y 6        | $p < 0.001^*$  |  | 6 y 2       | $p = 0.014^*$  |  | 7 y 4       | $p = 0.040^*$  |
| 1 y 7        | $p = 0.019^*$  |  | 6 y 3       | $p = 0.005^*$  |  | 7 y 8       | $p = 0.037^*$  |
| 2 y 3        | $p = 0.040^*$  |  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  |  | 8 y 3       | $p = 0.032^*$  |
| 2 y 4        | $p = 0.019^*$  |  | 6 y 5       | $p = 0.030^*$  |  | 8 y 4       | $p = 0.014^*$  |
| 5 y 3        | $p = 0.030^*$  |  | 6 y 7       | $p = 0.040^*$  |  | -           | -              |

**Nota:** Entre las comparaciones, el (1) representa el grupo control de iPSs no sometidas al medio de diferenciación osteogénica, y los números en adelante representan el grupo de células iPSs sometidas al medio de diferenciación osteogénica durante 3 días (2), 5 días (3), 7 días (4), 10 días (5), 14 días (6), 17 días (7) y 21 días (8). Los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre grupos ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , prueba ANOVA One-Way seguida de la prueba de Dunn).

## APÉNDICE 2

**Tabla 6:** Comparaciones estadísticas de las expresiones relativas de los componentes del complejo Shelterin del telómero (*Trf1*, *Trf2*, *Rap1*, *Tin2*, *Pot1a*, *Pot1b* y *Tpp1*) y de los componentes de la telomerasa (*Tert* y *Terc*) en los diferentes tiempos evaluados.

| <i>Trf1</i>  |                |             |                |             |                |
|--------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 3        | $p < 0.004^*$  | 2 y 7       | $p < 0.001^*$  | 4 y 7       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 4        | $p < 0.004^*$  | 2 y 8       | $p < 0.001^*$  | 4 y 8       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 5        | $p < 0.004^*$  | 2 y 9       | $p < 0.001^*$  | 4 y 9       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 6        | $p < 0.004^*$  | 3 y 5       | $p < 0.001^*$  | 6 y 5       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 7        | $p < 0.004^*$  | 3 y 6       | $p < 0.001^*$  | 6 y 8       | $p < 0.001^*$  |
| 1 y 9        | $p < 0.004^*$  | 3 y 7       | $p < 0.001^*$  | 6 y 9       | $p < 0.001^*$  |
| 2 y 1        | $p = 0.010^*$  | 3 y 8       | $p < 0.001^*$  | 7 y 8       | $p < 0.001^*$  |
| 2 y 3        | $p < 0.001^*$  | 3 y 9       | $p < 0.001^*$  | 7 y 9       | $p < 0.001^*$  |
| 2 y 4        | $p < 0.001^*$  | 4 y 3       | $p < 0.001^*$  | 9 y 8       | $p = 0.002$    |
| 2 y 5        | $p < 0.001^*$  | 4 y 5       | $p < 0.001^*$  | -           | -              |
| 2 y 6        | $p < 0.001^*$  | 4 y 6       | $p < 0.001^*$  | -           | -              |
| <i>Trf2</i>  |                |             |                |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 6        | $p = 0.012^*$  | 6 y 3       | $p = 0.003^*$  | 7 y 8       | $p = 0.048^*$  |
| 1 y 7        | $p = 0.003^*$  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  | 7 y 9       | $p = 0.017^*$  |
| 1 y 8        | $p = 0.019^*$  | 6 y 5       | $p = 0.045^*$  | 8 y 3       | $p = 0.040^*$  |
| 1 y 9        | $p = 0.036^*$  | 7 y 3       | $p < 0.001^*$  | 8 y 4       | $p = 0.013^*$  |
| 2 y 1        | $p > 0.050$    | 7 y 4       | $p < 0.001^*$  | 9 y 3       | $p = 0.010^*$  |
| 2 y 6        | $p = 0.048^*$  | 7 y 5       | $p = 0.015^*$  | 9 y 4       | $p = 0.003^*$  |
| 2 y 7        | $p = 0.025^*$  | 7 y 6       | $p = 0.032^*$  | -           | -              |
| <i>Rap1</i>  |                |             |                |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 5        | $p = 0.049^*$  | 5 y 4       | $p = 0.005^*$  | 6 y 9       | $p = 0.023^*$  |
| 1 y 6        | $p = 0.012^*$  | 5 y 7       | $p = 0.041^*$  | 7 y 3       | $p = 0.045^*$  |
| 1 y 9        | $p = 0.031^*$  | 5 y 8       | $p = 0.022^*$  | 8 y 3       | $p = 0.015^*$  |
| 2 y 1        | $p = 0.019^*$  | 6 y 3       | $p < 0.001^*$  | 9 y 3       | $p = 0.001^*$  |
| 2 y 5        | $p = 0.023^*$  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  | 9 y 4       | $p = 0.006^*$  |
| 2 y 6        | $p = 0.042^*$  | 6 y 5       | $p = 0.025^*$  | 9 y 7       | $p = 0.009^*$  |
| 2 y 9        | $p = 0.025^*$  | 6 y 7       | $p = 0.022^*$  | 9 y 8       | $p = 0.025^*$  |
| 5 y 3        | $p = 0.001^*$  | 6 y 8       | $p = 0.004^*$  | -           | -              |
| <i>Tin2</i>  |                |             |                |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 5        | $p = 0.025^*$  | 2 e 8       | $p = 0.041^*$  | 7 y 5       | $p = 0.042^*$  |
| 1 y 6        | $p = 0.002^*$  | 5 e 3       | $p = 0.013^*$  | 7 y 6       | $p = 0.030^*$  |
| 1 y 7        | $p < 0.001^*$  | 6 e 3       | $p = 0.001^*$  | 7 y 8       | $p = 0.017^*$  |
| 1 y 9        | $p = 0.007^*$  | 6 e 4       | $p = 0.017^*$  | 7 y 9       | $p = 0.019^*$  |
| 2 y 1        | $p > 0.050$    | 6 e 7       | $p = 0.049^*$  | 9 y 3       | $p = 0.003^*$  |
| 2 y 6        | $p = 0.045^*$  | 7 e 3       | $p < 0.001^*$  | 9 y 4       | $p = 0.040$    |
| 2 y 7        | $p = 0.013^*$  | 7 e 4       | $p = 0.004^*$  | 9 y 8       | $p = 0.010^*$  |
| <i>Pot1a</i> |                |             |                |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |
| 1 y 3        | $p = 0.019^*$  | 2 y 8       | $p = 0.036^*$  | 6 y 8       | $p = 0.003^*$  |
| 1 y 4        | $p = 0.047^*$  | 5 y 3       | $p = 0.049^*$  | 6 y 9       | $p = 0.043^*$  |
| 1 y 6        | $p = 0.049^*$  | 5 y 4       | $p = 0.011^*$  | 7 y 3       | $p = 0.001^*$  |
| 2 y 1        | $p > 0.050$    | 6 y 3       | $p < 0.001^*$  | 7 y 4       | $p = 0.005^*$  |
| 2 y 3        | $p = 0.003^*$  | 6 y 4       | $p < 0.001^*$  | 9 y 3       | $p = 0.019^*$  |
| 2 y 4        | $p = 0.012^*$  | 6 y 5       | $p = 0.020^*$  | 9 y 4       | $p = 0.049^*$  |
| 2 y 6        | $p = 0.016^*$  | 6 y 7       | $p = 0.025^*$  | -           | -              |
| <i>Pot1b</i> |                |             |                |             |                |
| Comparación  | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> | Comparación | <i>P value</i> |

|                    |                       |  |                    |                       |  |                    |                       |
|--------------------|-----------------------|--|--------------------|-----------------------|--|--------------------|-----------------------|
| 1 y 6              | $p = 0.017^*$         |  | 6 y 4              | $p = 0.017^*$         |  | 7 y 4              | $p = 0.022^*$         |
| 1 y 7              | $p = 0.005^*$         |  | 6 y 5              | $p = 0.010^*$         |  | 7 y 5              | $p = 0.003^*$         |
| 2 y 1              | $p > 0.050$           |  | 6 y 7              | $p = 0.032^*$         |  | 7 y 6              | $p = 0.032^*$         |
| 2 y 6              | $p = 0.011^*$         |  | 6 y 8              | $p = 0.013^*$         |  | 7 y 8              | $p = 0.004^*$         |
| 2 y 7              | $p = 0.049^*$         |  | 6 y 9              | $p = 0.016^*$         |  | 7 y 9              | $p = 0.035^*$         |
| 6 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | -                  | -                     |
| <b><i>Tpp1</i></b> |                       |  |                    |                       |  |                    |                       |
| <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |
| 1 y 5              | $p = 0.008^*$         |  | 2 y 8              | $p = 0.020^*$         |  | 6 y 7              | $p = 0.018^*$         |
| 1 y 6              | $p = 0.025^*$         |  | 2 y 9              | $p = 0.040^*$         |  | 6 y 8              | $p = 0.042^*$         |
| 1 y 7              | $p = 0.015^*$         |  | 5 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 9              | $p = 0.032^*$         |
| 1 y 8              | $p = 0.048^*$         |  | 5 y 4              | $p < 0.001^*$         |  | 9 y 3              | $p = 0.003^*$         |
| 1 y 9              | $p = 0.049^*$         |  | 5 y 7              | $p = 0.042^*$         |  | 9 y 4              | $p = 0.009^*$         |
| 2 y 1              | $p > 0.050$           |  | 5 y 8              | $p = 0.032^*$         |  | 9 y 7              | $p = 0.032^*$         |
| 2 y 5              | $p = 0.004^*$         |  | 5 y 9              | $p = 0.017^*$         |  | 9 y 8              | $p = 0.019^*$         |
| 2 y 6              | $p = 0.013^*$         |  | 6 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | -                  | -                     |
| 2 y 7              | $p = 0.049^*$         |  | 6 y 4              | $p = 0.002^*$         |  | -                  | -                     |
| <b><i>Tert</i></b> |                       |  |                    |                       |  |                    |                       |
| <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |
| 1 6                | $p < 0.001^*$         |  | 5 y 8              | $p = 0.049^*$         |  | 7 y 4              | $p < 0.001^*$         |
| 1 y 7              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 5              | $p < 0.001^*$         |
| 2 y 1              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 4              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 6              | $p < 0.001^*$         |
| 2 y 6              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 5              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 8              | $p < 0.001^*$         |
| 2 y 7              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 8              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 9              | $p < 0.001^*$         |
| 5 y 3              | $p = 0.009^*$         |  | 6 y 9              | $p < 0.001^*$         |  | 9 y 3              | $p = 0.028^*$         |
| 5 y 4              | $p = 0.044^*$         |  | 7 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | -                  | -                     |
| <b><i>Terc</i></b> |                       |  |                    |                       |  |                    |                       |
| <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |  | <b>Comparación</b> | <b><i>P value</i></b> |
| 1 y 6              | $p = 0.003^*$         |  | 6 y 5              | $p = 0.007^*$         |  | 7 y 6              | $p < 0.001^*$         |
| 1 y 7              | $p < 0.001^*$         |  | 6 y 8              | $p = 0.031^*$         |  | 7 y 8              | $p < 0.001^*$         |
| 2 y 1              | $p = 0.006^*$         |  | 6 y 9              | $p = 0.004^*$         |  | 7 y 9              | $p < 0.001^*$         |
| 2 y 7              | $p < 0.001^*$         |  | 7 y 3              | $p < 0.001^*$         |  | 9 y 2              | $p = 0.010^*$         |
| 6 y 3              | $p = 0.007^*$         |  | 7 y 4              | $p < 0.001^*$         |  | -                  | -                     |
| 6 y 4              | $p = 0.002^*$         |  | 7 y 5              | $p < 0.001^*$         |  | -                  | -                     |

**Nota:** Entre las comparaciones, (1) representa el grupo de células MEFs utilizadas para la reprogramación celular, (2) el grupo de iPSs no sometidas al medio de diferenciación osteogénica, y los números en adelante representan el grupo de células iPSs sometidas al medio de diferenciación osteogénica durante 3 días (3), 5 días (4), 7 días (5), 10 días (6), 14 días (7), 17 días (8) y 21 días (9). Los asteriscos (\*) representan diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre grupos ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , prueba ANOVA One-Way seguida de la prueba de Dunn).

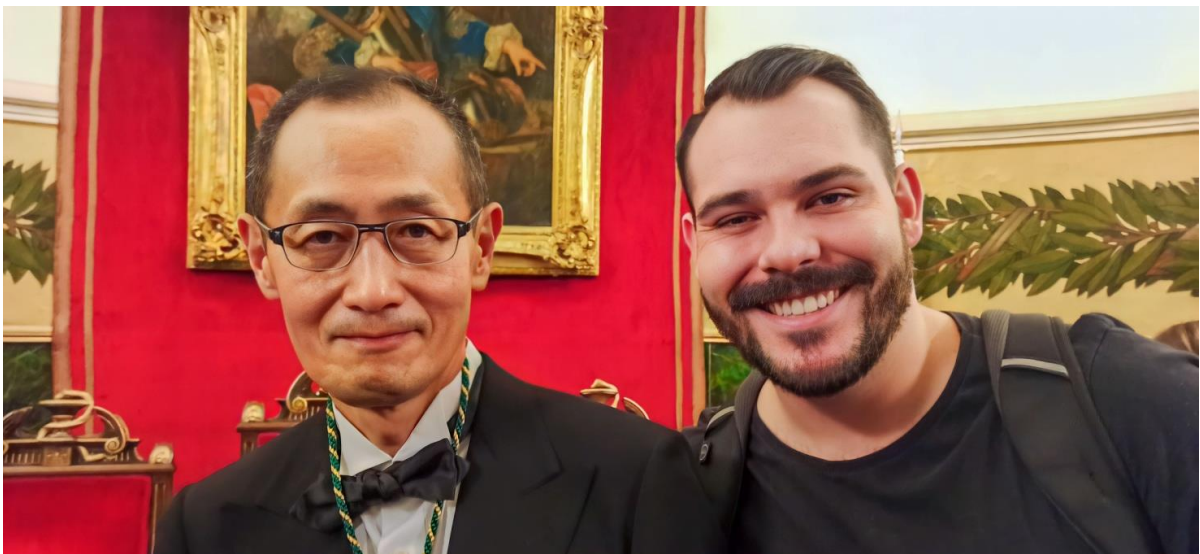
## ADJUNTO 1

- Participación presencial de la ponencia oral en el 27º Seminario Académico Internacional de la Asociación de Investigadores y Estudiantes Brasileños en la Cataluña (APEC) que pasó en Barcelona/ES del día 27 a 29 de octubre de 2022.



## ADJUNTO 2

- Registro fotográfico junto al investigador Dr. Shinya Yamanaka (Universidad de Kyoto, Japón), ganador del premio Nobel de Medicina en 2012 por lo descubrimiento de las células iPSs, durante sesión solemne de premios de investigación en la Real Academia Nacional de Medicina de España.



### ADJUNTO 3

- Registro fotográfico de la frente del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid/ES, donde se desarrolló la presente investigación reportada en este documento y, abajo, registro junto a Dra. María Blasco, supervisora de este proyecto, directora del CNIO y jefa del grupo de investigación “Telomeros y Telomerasa” del Programa de Oncología Molecular.





## ADJUNTO 4

- Carta de aprobación de la pasantía en el extranjero.

**cnio** *stop cancer*

Spanish National  
Cancer Research Centre  
(CNIO)

Maria A. Blasco, Ph.D.  
*Director*

Madrid, 13<sup>th</sup> February, 2023

To whom it may concern

It is with great pleasure I can write about the outstanding work that Robson Diego Calixto accomplished during his 6-months fellowship in the Telomeres and Telomerase Group at Spanish National Cancer Research Center (CNIO).

During his stage, he worked in “**Reprogramming of differentiated somatic cells into induced pluripotent cells (iPS) as a regenerative medicine tool**”. He reprogramming mouse embryonic fibroblasts (MEF) into iPS cells then performed differentiation into osteoblasts for review osteogenic potential and later he analyzed different telomeric parameters.

Robson Calixto displayed great talents in learning techniques applied to telomere biology such as management of cell lines, transfection, transduction, protein quantification, Western Blot, quantitative PCR and Telomere Restriction Fragment (TRF) for measurement the telomere length.

He was a very motivated student and during his training in my lab, he has demonstrated to be hardworking and capable of critical thinking. Robson got along well with everyone in the lab, pulled his own weight on the project, and had the ability to compromise with other team members.

In summary, Robson´s project was very successful and I approve its final report to be presented to FAPESP. If I can be of any further assistance, or you would like to ask me any specific question about Robson, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,



**Maria A. Blasco**  
Director of the Spanish National Cancer Research Center  
Telomeres and Telomerase Group  
Spanish National Cancer Center (CNIO)  
3 Melchor Fernandez Almagro  
Madrid - 28029 - Spain

Melchor Fernández Almagro, 3  
28029 Madrid, Spain  
Phone (+34) 91 7328000  
www.cnio.es