JOSÉ LUIZ NOGUEIRA

**Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas para
tentativa de correção da distrofia muscular em
modelo canino (GRMD)**

São Paulo
2011

JOSÉ LUIZ NOGUEIRA

**Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas
para tentativa de correção da distrofia muscular em modelo canino
(GRMD)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof°. Dr°. Carlos Eduardo Ambrósio

SÃO PAULO

2011

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas para tentativa de correção da distrofia muscular em modelo canino (GRMD)", protocolado sob o nº1839/2009, utilizando 02 (dois) cães, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Optimization and use of chimerics macroendonucleases attempt to reverse the muscular dystrophy in canine model (GRMD)", protocol number 1839/2009, utilizing 02 (two) dogs, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NOGUEIRA, José Luiz

Título: Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas para tentativa de correção da distrofia muscular em modelo canino (GRMD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa Renata Avancini Fernandes Nogueira e nossa filhinha Larissa Fernandes Nogueira, que são os melhores de Deus na minha vida. Nada é mais importante que tê-las ao meu lado. Com vocês me sinto forte para vencer qualquer batalha, pois lutamos juntos em amor e oração. Amo vocês.

A minha mãe Terezinha, que sempre será, em todas as conquistas da minha vida, motivos de orgulho e agradecimentos, pois soube me conduzir nos caminhos da vida. As minhas vitórias são as suas vitórias.

A minha irmã Bruna, pelo amor, carinho, apoio e companheirismo. Sabemos que sempre podemos contar um com o outro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela oportunidade de realizar um desejo, pelas palavras, fé, sabedoria, companhia e paciência.

Ao meu orientador Professor Carlos Eduardo Ambrósio, que me recebeu como orientado, mas tratou como amigo. Obrigado professor, por ter me aceito, ajudado e me compreendido. Não há palavras para agradecer, pois hoje eu sei onde estou e onde quero chegar. Muito obrigado!

A professora Luciana R. Bertolini, pela ajuda essencial no desenvolvimento do projeto, pelos ensinamentos e excelência. Posso dizer que sou privilegiado, tive nesse trabalho a ajuda dos melhores moleculares do Brasil. Muito obrigado professora.

A Maria Angélica Miglino pela confiança na pós graduação, seu trabalho e organização.

Aos cães do canil, pela companhia nos finais de semana.

Aos funcionários Conceição (Fortaleza), Augusto do canil (sábias palavras), Índio (companheiro), Jaque, Diogo, Ronaldo, Rose, Fátima, Branca, Bernadete, João e Raimundo. Vocês são incríveis, excelentes profissionais, muito obrigado por tudo, vocês são fundamentais em todos os projetos desenvolvidos no setor.

Ao secretário Maicon, pela capacidade. Mas principalmente pela amizade, pois a USP para nós não foi só um encontro acadêmico-profissional... Você é importante para mim e minha família do lado de fora também.

Aos colegas de pós graduação Rodrigo Barreto, Juliana Casals, Kelly, Joãozinho Morini, Bertassoli, Carol Costola, Rafa Agopian, Natal, Carol Pinho, Isabela, Dani Bragança, Sarmento, Nathia, Luciana, Renata, Graziela, Pedro.

AGRADECIMENTOS

Ao PH e Regina por me aceitarem a ficar em sua casa e indicar a pós graduação.

A minha querida esposa muito obrigado por simplesmente existir em minha vida.

Ao meu amigo do peito Marcão, você sempre esteve ao meu lado, dando bons conselhos, me falando palavras de fé e eu sou eternamente grato por tudo o que você representa!

Ao meu amigo Valdir, por seu meu companheiro para toda e qualquer hora.

As minhas queridas Letícia, Mariazinha e Isabel, pela amizade, companheirismo, comidas gostosas, bons conselhos e carinho.

As minhas amigas Dilayla e Elaine pelas risadas, plantões e passeios com Larissa!

Ao Professor Antonio Fernandes Filho, obrigado pelas sábias palavras, pelo apoio e incentivo, para nunca desistir desse sonho chamado anatomia. Tenho orgulho de ser chamado de seu neto.

Vovô Mauro, vovó Guigui e vovó Nicinha, obrigado pelo apoio, pelas risadas, pelo cuidado com minha filhinha, amo muito vocês. É uma honra tê-los como avós.

Marco e Magaly, obrigado pela amizade, pelas noites de conversas, pelo acolhimento (que Deus os retribua) e principalmente, por terem feito a Renata e a confiado a mim.

Ao Kaio e a Livia, pela amizade e descontrações nos finais de semana.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de coleta de medula, Dilayla, Greyson e Matheus muito obrigado.

A Fabiele Russo, por ter concedido uma garrafa de célula, para que eu aprendesse a cultivá-la.

A Sônia, Dayane, Paula Fratini e Letícia, pelo suporte na citometria de fluxo.

Aos Amigos de Fortaleza: Igor, Cristiano, Malu, Saul, Leonardo, Neto, Raquel F., Raquel M., Carol, Kaio, Anderson, Juliana, Débora, Tati e Marcelo, a ajuda e amizade de vocês fizeram grande diferença.

Aos professores Pedro Bombonato, Edson Liberti, Patrícia Braga, Graciela Pignatari, João Palermo, Paula Papa, Roberto Kfoury, Maria Angélica, Carlos Eduardo, Assis, pelas aulas e conversas.

Ao Professor José Roberto Kfoury Jr, por abrir seu laboratório as minhas células e me orientar no programa PAE.

Ao Dr. David Feder, por ser um exemplo de força, coragem e esperança. O senhor nos faz lutar para que achemos as melhores possibilidades terapêuticas para a distrofia muscular.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo apoio financeiro. Processo: 2009/13282-9.

RESUMO

NOGUEIRA, J. L. **Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas para tentativa de correção da distrofia muscular em modelo canino (GRMD).** [Optimization and use of chimerics macroendonucleases attempt to reverse the muscular dystrophy in canine model (GRMD)]. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As doenças genéticas degenerativas atingem milhões de crianças em todo o mundo. Dentre essas doenças, a distrofia muscular, caracterizada como uma doença monogênica poderia ser tratada na sua origem através da terapia gênica. Assim, este estudo propõe à correção da mutação no gene da distrofina, causador da distrofia muscular através de modificações genéticas específicas. A criação de novas classes de terapêuticos que podem desencadear rearranjos no DNA genômico de maneira específica representa uma nova promessa para experimentos em terapia gênica. A tecnologia usada foi o RNA interferente (RNAi) que é utilizada para regulação da expressão gênica pós-transcricional. A Ku 70 é uma das proteínas específicas para a recombinação não homóloga, o RNAi foi usado na tentativa de atenuar a Ku70, prevalecendo então a expressão da recombinação homóloga, com intuito de corrigir a mutação gênica causadora da distrofia muscular em cães. Para tal avaliação, utilizamos linhagens de células tronco (CT) mesenquimais recentemente isoladas, oriundas de populações mononucleares da medula óssea de cães jovens afetados pela distrofia muscular, apresentando bons resultados em cultivo e caracterização. Este trabalho proporciona além da criação de uma nova terapêutica específica para a correção da distrofia muscular, o aumento do conhecimento e entendimento na indução de modificações genômicas em células, no desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos moleculares que representam um grande potencial em estudos e no tratamento de várias doenças genéticas e infecciosas, degenerativas ou adquiridas.

O presente trabalho apresenta métodos de isolamento e caracterização de células tronco-mesenquimais bem como a utilização de RNAi visando promover recombinação homóloga entre o DNA transfectado e o alvo no DNA genômico.

Palavras-chave: Células tronco. Medula óssea. RNAi. Distrofia muscular. Terapia gênica.

ABSTRACT

NOGUEIRA, J. L. **Optimization and use of chimerics macroendonucleases attempt to reverse the muscular dystrophy in canine model (GRMD).** [Otimização e utilização de macroendonucleases quiméricas para tentativa de correção da distrofia muscular em modelo canino (GRMD)]. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The degenerative genetic diseases affect millions of children around the world. Among these diseases, muscular dystrophy, characterized as a monogenic disease can be treated at its source through gene therapy. Thus, this study proposes the correction of the gene that causes muscular dystrophy through genetic modification specific. The creation of new classes of therapeutics that can trigger rearrangements in the genomic DNA in a specific manner represents a new promise for gene therapy experiments. The technology will be used by RNA interference (RNAi) and that used to regulate gene expression post-transcriptional. The 70 Ku is a protein specific to the non-homologous recombination, RNAi was used in an attempt to mitigate the Ku70, then the prevailing expression of homologous recombination, aiming to correct the mutation that causes muscular dystrophy in dogs. For this evaluation, we use mesenchymal stem cell lines recently isolated populations derived from bone marrow mononuclear cells of young dogs affected by muscular dystrophy, presenting good results in characterization and culture. This work also provides the creation of a new specific therapy for the correction of muscular dystrophy, increased knowledge and understanding in the induction of genomic changes in cells in the development of new classes of molecular therapeutic agents have great potential in studies and treatment of various genetic and infectious diseases, degenerative or acquired. This paper presents methods for isolation and characterization of mesenchymal stem cells and the use of RNAi to promote homologous recombination between transfected DNA and genomic target DNA.

Key words: Mesenchymal stem cells. Bone-marrow. RNAi. Muscular dystrophy. Gene therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DISTROFIAS MUSCULARES	18
2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS	19
2.3 CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER COMO MODELO EXPERIMENTAL NO TRATAMENTO DE DISTROFIAS MUSCULARES	20
2.4 CÉLULAS TRONCO DE ANEXOS EMBRIONÁRIOS	22
2.5 CÉLULAS TRONCO ORIUNDAS DE MEMBRANAS FETAIS	24
2.6 CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA	26
2.7 A TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS TRONCO	27
2.8 TERAPIA GÊNICA	29
2.9 GENE TARGETING	30
2.10 MECANISMOS DE SILENCIAMENTO POR RNAi	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS	37
4.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DISTROFIA MUSCULAR EM GOLDEN RETRIEVERS POR <i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> (RFLP)	37
4.3 LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS	38
4.3.1 Extração e cultura de células do cordão umbilical	39
4.3.2 Extração e cultura de células das membranas fetais	40
4.3.3 Extração e cultura de células da medula óssea	41
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO	44
4.4.1 Protocolo da curva de crescimento	44
4.4.2 Citometria de fluxo	44
4.4.3 Caracterização das células tronco	46
4.4.3.1 Diferenciação osteogênica	46
4.4.3.2 Diferenciação condrogênica	46
4.5 PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO PEGFP-N1	47
4.6 TRANSFEÇÃO DO DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA CANINA	49
4.6.1 Transfecção do vetor pEGFP por lipofectamina	49
4.6.2 Transfecção das células por Eletroporação	50
4.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR DOADOR	51
4.7.1 Extração de DNA genômico	51
4.7.2 Amplificação de um fragmento do DNA genômico	51
4.7.3 Clonagem do BD no vetor pCR TM 2.1-TOPO [®] (Invitrogen)	53
4.8 PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA INTERFERÊNCIA (RNAI)	54
4.9 TRANSFEÇÃO DO RNAI	59
4.9.1 Transfecção por lipofetamina	60
4.10 PCR-RT	61
5 RESULTADOS	63

5.1 LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS.....	63
5.1.1 Extração e cultura de células do cordão umbilical	63
5.1.2 Extração e cultura de células das membranas fetais.....	63
5.1.3 Extração e cultura de células da medula óssea	64
5.1.3.1 Curvas de crescimento.....	67
5.1.3.2 Citometria de fluxo.....	67
5.1.3.3 Caracterização (Potencial de diferenciação)	69
5.2 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO GÊNICO MUTANTE RESPONSÁVEL PELA DISTROFIA MUSCULAR.	69
5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DISTROFIA MUSCULAR EM GOLDEN RETRIEVERS POR <i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> (RFLP).....	70
5.4 CONSTRUÇÃO DO VETOR DOADOR.....	71
5.5 PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA INTERFERÊNCIA	71
5.6 TRANSFEÇÃO DO VETOR pEGFP POR LIPOFECTAMINA E POR ELETROPORAÇÃO NAS CTMs DE MOA DE CÃES JOVENS DISTRÓFICOS.....	72
5.7 EFICIÊNCIA DO RNAi POR PCR EM TEMPO REAL.....	73
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são um grupo de doenças genéticas e fenotipicamente heterogênea, caracterizadas por atrofia muscular progressiva, que pode levar à morte prematura em formas graves como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (WANG et al., 2009). A incidência da DMD é de um para cada três mil e quinhentos meninos nascidos vivos (BERNE, 2004; JORDE, 2004; STROBER, 2006) e, no Brasil, estima-se que ocorram mais de 400 novos casos por ano desde 1993 (ARAUJO et al., 2004).

Para o estudo da DMD, há modelos experimentais utilizados, como: cães, gatos, peixes e invertebrados. No entanto, o cão Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é o melhor modelo caracterizado para DMD, pois suas manifestações genótípicas e fenotípicas são as que mais se assemelham a doença em humanos (COOPER et al., 1988; COLLINS; MORGAN, 2003). Tendo em consideração as semelhanças clínicas e patológicas entre cães e humanos DMD(s), nós propomos a utilização destes animais como modelos para a avaliação de novas tecnologias em terapia celular juntamente com a terapia gênica.

A análise de modelos experimentais de estudo da hematopoiese em cães proporcionou informações importantes sobre o transplante de células tronco hematopoiéticas (CTHs), permitindo a transposição destes achados para os seres humanos, sendo considerados modelos de experimentação comparada muito promissores (NAKAGE et al., 2009).

O transplante de CTHs derivadas do cordão umbilical têm sido amplamente utilizado em vários tipos de patologias, incluindo desordens metabólicas, imunodeficiências adquiridas, e distúrbios hematológicos (BARKER; WAGNER, 2003).

A correlação morfológica de síntese, absorção, transporte e eritropoiese são encontrados no saco vitelino do cão no final da gestação e diminuem bem próximo ao parto. No embrião em desenvolvimento, a hematopoiese inicial e a estrutura vascular são identificadas como ilhas de sangue do saco vitelino. Ilhas de sangue são formadas de mesoderma agregados que tem migrado no início da formação (MIGLINO et al., 2006).

Células do saco vitelino isoladas por volta do dia 9 podem ser enxertadas em um novo organismo, com capacidade de repovoar um tecido logo após o transplante, no fígado de camundongos recém-nascidos (YODER et al., 1997). Já as células tronco (CT) do líquido amniótico expressam Oct-4, um marcador específico de células tronco pluripotentes, e essas possuem uma elevada capacidade proliferativa e de diferenciação (SIEGEL et al., 2007).

Diferentemente do que ocorre em outros órgãos, a medula óssea é composta por dois sistemas de CT: o sistema hematopoiético e o sistema estromal (BIANCO et al., 2001). No entanto, as células progenitoras multipotentes, definidas como células tronco mesenquimais (CTMs), ganharam destaque nas pesquisas devido ao seu fácil isolamento *in vitro* e seu potencial de diferenciação em linhagens mesodermas. Estas células já foram bem caracterizadas *in vitro*, sendo demonstrada sua habilidade em diferenciação osteogênica, condrogênica, miogênica, tendínea, dérmica e adipogênica (CAPLAN, 1991, 2001).

Vale ressaltar que não existe um tratamento eficaz para essas desordens até o presente momento, mas novas estratégias estão sendo desenvolvidas para substituir ou reparar o gene defeituoso (WANG et al., 2009).

A terapia gênica visa à substituição do gene defeituoso por um gene normal, ou seja, a correção do defeito e a cura permanente. A remoção de um gene do organismo é, entretanto, algo muito difícil de ser realizado. Assim, os procedimentos mais utilizados envolvem, em geral, a introdução ou simples adição do gene de interesse, que deve ser completamente conhecido. A correção gênica apresenta várias vantagens sobre a adição gênica, e uma das formas de obtenção seria através do *gene targeting*, processo pelo qual um segmento de DNA exógeno substitui uma sequência de DNA genômico via recombinação homóloga (RH). Técnica utilizada para promover manipulações genômicas precisas, sendo potencialmente ideal para a terapia gênica (PRUETT-MILLER et al., 2008). As moléculas de RNAi tem sido empregadas com sucesso para atenuação da proteína Ku70, sendo esta proteína responsável pela recombinação não-homóloga (NHEJ), a principal forma de reparo do DNA em células de mamíferos. Dentre as proteínas utilizadas por essa via estão descritas as proteínas

Ku70 e Ku86 (LIEBER et al., 2003; AHNESORG; SMITH; JACKSON, 2006; BUCK et al., 2006; BERTOLINI et al., 2009).

Segundo Wang et al. (2009) os avanços recentes na área sugerem que terapias eficazes para DMD ainda estão em estudos. Por causa da complexidade desta doença, é possível que seja necessário combinar múltiplas abordagens para conseguir um tratamento bem sucedido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para tornar a revisão mais compreensível, a mesma foi dividida em tópicos, da seguinte maneira: 2.1 Distrofias musculares, 2.2 Modelos experimentais, 2.3 Cães da raça Golden Retriever como modelo experimental no tratamento de distrofias musculares 2.4 Células tronco de anexos embrionários, 2.5 Células tronco oriundas de membranas fetais, 2.6 Células tronco da medula óssea, 2.7 A terapêutica das células tronco, 2.8 Terapia gênica, 2.9 Gene targeting, 2.10 Mecanismos de silenciamento por RNAi

2.1 DISTROFIAS MUSCULARES

As distrofias musculares são um grupo heterogêneo de doenças hereditárias, degenerativas, em sua maioria não inflamatórias, caracterizadas por fraqueza muscular progressiva e debilitação do indivíduo (SHELTON; ENGVALL, 2002; KOBAYASHI et al., 2009). A relação das doenças musculares em humanos continua a aumentar, com mais de 30 formas diferentes, cuja herança pode ser autossômicas dominantes, recessivas ou recessivas ligada ao cromossomo X (ZATZ; VAINZOF; PASSOS-BUENO, 2000).

As distrofias musculares progressivas (DMPs) são doenças hereditárias degenerativas, ou seja, caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética (SHELTON; ENGVALL, 2002).

Através da engenharia genética foi possível mapeá-las e assim observar que fenômeno genético as afetam. Em portadores de DMD a proteína distrofina está ausente por deleção, ou encontra-se defeituosa, devido falha de síntese do RNA mensageiro. Sabe-se que é uma deleção ou um defeito na região média do braço curto do cromossomo X, esse é um dos maiores gene humano com 79 éxons dispersos sobre uma região de DNA com cerca 2.300kb, responsável pela síntese da proteína distrofina

(SILVA; COSTA; CRUZ, 2003), ausente no músculo de pacientes afetados por esta patologia (YOKOTA et al., 2009).

A DMD e Distrofia Muscular de Becker (DMB) são caracterizadas como desordens alélicas recessivas ligadas ao cromossomo X (SHELTON et al., 2001). DMD e DMB são causadas por mutações no gene da distrofina, uma proteína citoesquelética, que faz parte de um complexo de proteínas responsáveis pela permeabilidade da membrana das células musculares, as quais pertencem ao complexo distrofina-glicoproteínas. Uma deficiência primária em qualquer uma das proteínas do complexo acarreta uma desintegração de todo o complexo com uma deficiência secundária dos outros componentes, provocando diferentes tipos de distrofias musculares. Dessa forma, a integridade muscular depende de todas as proteínas do complexo que leva a uma ausência dessa proteína nos músculos cardíacos e esqueléticos. Essas proteínas tem algumas funções importantes sendo que a principal é a manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (SHELTON et al., 2001; COLLINS; MORGAN, 2003).

O quadro clínico é muito variável, com formas graves de progressão rápida no início da infância e formas mais benignas com progressão mais lenta no início da idade adulta e, sendo a DMD uma das degenerações progressivas mais graves e mais comuns. Esta, só afeta meninos que aparentemente são normais, mas que com o tempo vão perdendo aos poucos suas habilidades motoras. Em torno dos 10 anos, em geral, tornam-se dependentes de cadeira de rodas. Caso não tenham um atendimento especial, a morte ocorre por volta dos 20 anos, como decorrência de insuficiência cardíaca ou respiratória, devido ao comprometimento do diafragma (EMERY, 1993).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Sabe-se que os resultados obtidos em cultura nem sempre são reproduzidos *in vivo* e, portanto torna-se crucial a realização de experimentos em modelo animal (NUNES et al., 2007).

A doença resultante da falta da distrofina é a mais severa e comum (COLLINS; MORGAN, 2003), manifesta-se em seres humanos, cães da raça Golden Retriever (COOPER et al. 1988), gatos (*Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy* – HFMD) (GASCHEN; SWENDROWSKI; HAUGH, 1994) e em camundongos *mdx* (*X-linked Muscular Dystrophy*) (MORGAN; COULTON; PARTRIDGE, 1989).

Um dos modelos animais mais usados para DMD é o camundongo *mdx*, que contém uma mutação pontual que resulta na produção de distrofina disfuncional. Apesar de apresentar algumas patologias musculares, estes camundongos apresentam diferenças morfofuncionais dos músculos acometidos em relação aos humanos (COLLINS; MORGAN, 2003). Embora o camundongo com a mutação do cromossomo X (*mdx*) seja o modelo animal mais utilizado em estudos da patogênese e dos efeitos da terapia gênica e transplante celular, a lenta progressão da doença nesse modelo o torna clinicamente pouco viável para se transpor resultados para humanos portadores de DMD. O quadro clínico do *mdx* é mantido relativamente normal, já que apresenta uma menor degeneração das fibras musculares, maior regeneração e menos fibrose do que encontrado nos pacientes com DMD (PASTORET; SEBILLE, 1995; SHELTON; ENGVALL, 2004).

Outro modelo animal, o camundongo “double knockout” (dko) não produz distrofina nem utrofina, uma proteína homóloga. No entanto, estes camundongos apresentam fraqueza muscular progressiva bastante similar à pacientes com DMD (DECONINCK et al., 1997). Os dados mencionados limitam-se a estudos com camundongos, por não caracterizarem modelos reprodutíveis.

2.3 CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER COMO MODELO EXPERIMENTAL NO TRATAMENTO DE DISTROFIAS MUSCULARES

Para algumas raças de cães foram identificadas mutações no gene que codifica a distrofina, entre as raças: o Golden Retriever, o Rottweiler, o Pointer Alemão e o Beagle. Dentre essas, a GRMD tem sido a mais estudada e a melhor caracterizada

(HOWELL et al., 1997). Em 1958, Méier documentou o primeiro caso de cão com distrofia em um filhote de Golden Retriever. Desde as primeiras descrições, a mutação do gene da distrofina no GRMD tem sido identificada e então, este modelo animal tem sido reconhecido e amplamente utilizado nas avaliações experimentais de novos tratamentos previamente aos estudos clínicos em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2004).

No GRMD, o defeito genético não é causado pela deleção da mutação, pelo contrário, a mutação no gene da distrofina em cães ocorre em um sítio específico no íntron 6, tendo como resultado, o éxon 7 ignorado durante o processamento do RNA mensageiro (mRNA) da distrofina no GRMD. Esta mutação acarreta a cessação antecipada após a adição de 8 aminoácidos, fazendo com que haja alterações no quadro de leitura. Esse defeito foi definido, utilizando dois primers derivados de seqüências de íntrons em ambos os lados do éxon 7, a partir de cães clinicamente normais e cães afetados através de seqüência comparativa (BARTLETT et al., 1996).

Por ser geneticamente homólogo ao humano, compartilha seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico letal. Tanto na DMD como na GRMD, a necrose e regeneração começam cedo no músculo esquelético e estão associados com a proliferação do tecido conjuntivo (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1988; VALENTINE et al., 1990; COLLINS; MORGAN, 2003).

Concomitantemente a estes fatos, os cães apresentam tamanho relativamente grande, vida longa e doenças genéticas homólogas àquelas dos humanos, quando comparados a camundongos (NAKAGE et al., 2009).

Em cães GRMD, acasalando-se uma fêmea heterozigota com um macho afetado, teremos o nascimento de fêmeas heterozigotas, fêmeas afetadas, machos afetados e machos normais (VALENTINE et al., 1988). Para simplificar, podemos utilizar um heredograma (Figura 1), com a visualização das probabilidades genéticas da DMPs.

Figura 1 – Heredograma da Distrofia Muscular Progressiva, mostrando 25% de probabilidade de ocorrer em fêmea portadora, 25% fêmea afetada, 25% macho normal e 25% macho afetado

Nos neonatos, pode-se notar uma distribuição seletiva das lesões, sendo os músculos da respiração, sucção e locomoção (diafragma, língua, pescoço, tronco e porção proximal dos membros, respectivamente) os mais afetados por serem os mais ativos durante esse período (VALENTINE; COOPER, 1991).

Pesquisas que utilizam CT para transplantes ou terapia gênica em cães portadores de distrofia muscular têm sido desenvolvidas por alguns grupos. Os cães GRMD são animais de porte médio (quando adultos pesam cerca de 15 - 25 quilos), sendo comparáveis aos humanos e dessa forma constituem um modelo ideal para estudos sobre a DMD.

Além disso, ao contrário do camundongo *mdx* que não apresentam fraqueza muscular, o cão GRMD apresenta várias características clínicas semelhantes à distrofia humana, tais como: degeneração do músculo e fraqueza muscular; comprometimento cardíaco e respiratório, macroglossia com alteração da mímica facial, problemas de deglutição e alterações esqueléticas (SHELTON; ENGVALL, 2002; COLLINS; MORGAN, 2003).

2.4 CÉLULAS TRONCO DE ANEXOS EMBRIONÁRIOS

Entre as fontes de células tronco adultas (CTA) (medula óssea, sangue periférico, tecido subcutâneo), mais precisamente as células progenitoras

mesenquimais está o sangue de cordão umbilical. Sua principal função é o transporte de nutrientes e preencher as crescentes demandas de oxigênio da mãe para o feto (ALMEIDA et al., 2000).

Alguns autores afirmam que as CTHs do cordão umbilical contêm grande quantidade de células progenitoras (BARKER et al., 2003).

Vários pesquisadores afirmaram que as células CD34+ do sangue do cordão umbilical possuem um maior potencial proliferativo e requerem fatores de crescimento diferentes daquelas células CD34+ da medula (BARKER et al., 2003). O número de unidades formadoras de colônias relacionadas aos granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (CFU – GEMM) assim como a capacidade proliferativa dessas células, mostram-se razoavelmente maior no sangue do cordão umbilical de neonatos se comparado ao sangue periférico de indivíduos adultos (MITCHELL, 1997).

Grupos de células esféricas expressando diversos marcadores de CTHs foram observados no interior das principais artérias intra-corpóreas (AGM) e extra-embrionárias (vitelínica e umbilical) em embriões de camundongos (GARCIA-PORRERO; GODIN; DIETERLEN-LIÉVRE, 1995; NORTH; STACY, 1999) e humano (TAVIAN et al., 1996; TAVIAN; HALLAIS; PEULT, 1999), e acredita-se que representem CT de linhagens hematopoiéticas definitivas. CTHs definitivas são também formadas no saco vitelino (MULLER et al., 1994).

A correlação morfológica de síntese, absorção, transporte e eritropoiese são encontrados no saco vitelino do cão no final da gestação e diminuem bem próximo ao parto. No embrião em desenvolvimento, a hematopoiese inicial e estrutura vascular são identificadas como ilhas de sangue do saco vitelino. São formadas de mesoderma, agregados que migram no início da formação (MIGLINO et al., 2006).

As células externas são diferenciadas em células endoteliais e as internas, em sangue primitivo. O término da associação do desenvolvimento entre hematopoiese e células endoteliais sugere que elas partam de um progenitor comum, o hemangioblasto (CHOI, 2002) e também evidenciado em cães (MIGLINO et al., 2006).

As células tronco embrionárias (CTE) representam linhagens celulares permanentes que podem ser mantidos em um estado indiferenciado. São derivadas das

três camadas germinativas embrionárias: mesoderma, ectoderma, e endoderme. Estas características conferem grande potencial de CTE (VAAGS et al., 2009).

Vaags et al. (2009) analisaram a derivação de linhagens de células canina permanentes de pré-implantação, na fase embrionária comprovando que semelhante as CTE em humanos, as CTE canina expressa OCT3 / 4, NANOG, Sox2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, e fosfatase alcalina. Eles mantiveram um cariótipo normal e morfologia típica de células indiferenciadas após várias passagens *in vitro* e mudanças de criopreservação.

2.5 CÉLULAS TRONCO ORIUNDAS DE MEMBRANAS FETAIS

O saco vitelino em cães é uma membrana fetal, composta morfologicamente por três camadas: uma simples camada de endoderma, um simples mesotélio e, intermediário a eles, o mesênquima vascular. Nesta espécie o saco vitelino persiste até o nascimento, como uma estrutura enrugada e altamente vascularizada (LEE; MATTHEWS; BLAIR, 2005) e de grande importância como um mediador de trocas entre a mãe e o embrião (PERRY, 1981; RÜSSE et al., 1992).

Trabalhos realizados por Globerson et al. (1987); Liu; Auerbach, (1991) e Garcia-Porrero; Godin; Dieterlen-Lièvre (1995), identificaram uma população pluripotente de células no saco vitelino capazes de diferenciar em células hematopoiéticas.

Outro tipo de célula tronco que pode ser isolada *in vitro* a partir do saco vitelino é a CTMs. Neste contexto há somente um trabalho, realizado por Wang et al. (2008). As CTMs isoladas do saco vitelino de humanos possuíam morfologia fibroblastóide e eram hábeis em formar colônias. Estas células eram imunopositivas para marcadores de pluripotência como OCT-4 e Nanog e para os marcadores mesenquimais CD105, CD73, CD29, CD44, CD166, e HLAABC e eram negativas para marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD45, CD14, CD19, CD34, e CD31. Ao avaliar o potencial de diferenciação em tecidos mesodermas, as CTMs do saco vitelino se

diferenciaram somente para osteoblastos e adipócitos. Contudo, o potencial da membrana vitelínica tem muito a ser investigado.

As células tronco do saco vitelino possuem morfologia homogênea e são primitivas e, portanto não expressam marcadores de células maduras na sua superfície ou antígenos codificados pelo MHC (complexo de histocompatibilidade principal) associados à rejeição de enxertos de tecidos. Durante o desenvolvimento, células tronco do saco vitelino migram temporariamente para o fígado fetal e finalmente localizam-se na medula óssea, local permanente de formação de células sanguíneas (HOLLANDS, 1987).

Em relação as células amnióticas, o potencial de diferenciação, espera-se que a membrana amniótica possa manter propriedades pluripotentes. Durante o desenvolvimento, a massa celular interna do blastocisto, a partir da qual são derivadas as células tronco embrionárias, origina o epiblasto (a partir do qual é obtido o embrião) e hipoblasto (a partir do qual é derivado o saco vitelino). A partir do epiblasto (ectoderma embrionário), é obtida a camada epitelial da membrana amniótica (ectoderma amniótico), enquanto as células mesenquimais (mesênquima amniótico) são da linha primitiva da mesoderme extra-embrionária (ENDERS; KING, 1988).

Acredita-se que as células epiteliais amnióticas possuam capacidade de originar as três camadas germinativas, uma vez que, o epiblasto origina todas as camadas germinativas do embrião. Além disso, a camada epitelial do amniótico é originada antes da gastrulação, ou seja, antes da diferenciação e especificação celular. Desta forma é esperado que as células epiteliais amnióticas possam manter a plasticidade existente nas células da pré-gastrulação do embrião (MIKI et al., 2005).

Int'Anker et al. (2004), analisaram através da curva de crescimento, as CTMs obtidas do fluído amniótico e da membrana amniótica, e concluíram que elas são similares. Com este dado, eles hipotetizaram que as CTMs oriundas do fluido amniótico são, pelo menos em partes, derivadas do âmnio.

2.6 CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA

As CT oriundas da medula óssea tem participação no reparo tecidual, e por esse motivo, elas vêm sendo cada vez mais investigadas e estudadas.

A medula óssea é composta por duas linhagens celulares distintas e dependentes, a hematopoiética e o estroma associado, que formam um sistema cooperativo. As células do estroma medular, também conhecidas como CTMs, estão relacionadas à manutenção de um microambiente de preservação das CTHs, sendo que a progênie já diferenciada recebe os sinais necessários para a maturação celular (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

Já em 1966, Friedenstein et. al., consideraram que aspirados da medula óssea são mais acessíveis e apresentam fontes ricas em CTMs, quando comparados às células do timo e baço. Mais atualmente, em 2003, Hu et al. inclui células obtidas de vários locais tanto do organismo humano como do organismo animal, como fonte de CTM, entre elas cartilagem, periósteo, líquido sinovial, músculos e tendões. Tecidos fetais, placenta, vasos sanguíneos e sangue do cordão umbilical são citadas como fontes de CTMs, porém, essas fontes apresentam pouca quantidade desse tipo celular quando comparado com a medula óssea (WEXLER et al., 2003).

As CTMs encontradas na medula óssea têm a capacidade de se renovar e de se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular (CAMPAGNOLI et al., 2001; ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIRNOV, 2003).

Além das CT existentes na medula óssea, CTHs e CTMs, recentemente foi identificada uma rara população de células tronco não hematopoiéticas com características similares as células tronco pluripotentes (KUCIA et al., 2005; RATAJCZAK et al., 2007). Esta rara população de CT é hábil em se diferenciar em todas as células das três camadas germinativas. Estas células foram descritas na literatura como CT semelhantes a embrionárias (BELTRAMI; CESSSELL; BERGAMIN, 2007).

As CT semelhantes às embrionárias podem ser isoladas da medula óssea a partir de métodos de *cell sorting*. Porém foi demonstrado que estas células podem ser encontradas circulantes mediante situações de injúrias teciduais, as quais irão facilitar a regeneração do órgão danificado (KUCIA; RECA; CAMPBELL, 2006).

A medula óssea pode ser obtida em diversos locais, sendo a crista ilíaca a principal fonte. A colheita pode ser realizada por meio de punção com agulha de biópsia (DEL CARLO et al., 2004). Recomenda-se que a seringa seja lavada com solução salina heparinizada, com o propósito de evitar a formação de coágulos (TIEDEMAN et al., 1991). E ainda, estudos têm demonstrado que a heparina não afeta a viabilidade das células isoladas da medula óssea (SALAMA; WEISSMAN, 1978; SOUZA, 2009).

2.7 A TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS TRONCO

As CT podem ser classificadas em três categorias de acordo com o período de isolamento durante a ontogênese: embrionária, fetal e adulta (GAGE, 2000). Na fase embrionária são consideradas totipotentes, pois podem gerar todos os 216 tipos de tecidos celulares presentes no corpo humano, podendo então recuperar qualquer tecido do organismo (KIRSCHSTEIN; SKIRBOLL, 2001). Já na fase adulta são consideradas multipotentes, pois tem uma plasticidade mais limitada e reparam qualquer tecido lesionado (FUCHS; SEGRE, 2000; PEREIRA, 2008).

A terapia utilizando CT, é um método atraente para o tratamento de DMD, porque precisa de um pequeno número de células para obter um efeito terapêutico (FARINI et al., 2009).

Várias tentativas terapêuticas já foram propostas ou testadas na DMD, incluindo administração de diferentes drogas (ZATZ; FROTA-PESSOA, 1981; EMERY, 1993; CAMIRAND et al., 2001) e transplante de mioblastos, sem sucesso (RAGOT et al., 1993; PASSOS-BUENO et al., 1994; YUASA et al., 1998; CAMIRAND et al., 2001).

Uma possível forma de fornecimento da cópia normal do gene para todos os grupos musculares afetados de um indivíduo consiste no transplante de CT. Essas são

indiferenciadas, capazes de se dividir indefinidamente mantendo a habilidade de diferenciar-se em tipos celulares específicos. São capazes de sobreviver ao longo de toda a vida no organismo, mantendo seu número, produzindo populações de células filhas ou podem se diferenciar em um determinado tipo celular (LEVIN et al., 2004). Elas encontram-se presentes em diversos tecidos, como na medula óssea, na polpa de dente, no cordão umbilical de um recém-nascido, aderidas aos vasos sanguíneos, e em pequeno número em outras partes do corpo (ZATZ, 2004).

Tsumagari et al. (2007) caracterizaram células CD34 positivas (CD 34+) na medula óssea, no sangue periférico e no sangue do cordão umbilical de cães. Sabe-se que as CT, principalmente as hematopoiéticas, apresentam o antígeno de membrana CD34, o que torna possível a identificação de tais células por métodos imunocitoquímicos. As CT CD34+ podem ser separadas pela seleção eletromagnética positiva (BARKER; WAGNER, 2003).

Esse sistema de purificação das CT é importante para o aprimoramento dos transplantes de CT de cordão umbilical (CTCU), pois os linfócitos T, que são responsáveis pela rejeição em transplantes, são quase 100% excluídos da amostra a ser transplantada, levando os riscos de rejeição a níveis mínimos. Com o avanço da tecnologia para a separação de células e com a descoberta da multipotência das CT, a ciência possui grandes perspectivas de sucesso com as pesquisas (SCHUMM et al., 1999).

Estudos feitos por Kucia, Reka, Campbell (2006) descreveram sobre uma população homogênea (0,01% da população de células mononucleares da medula óssea) Sca-1 e CD45 negativas identificadas na medula óssea de camundongos. As mesmas expressavam marcadores de células tronco pluripotentes como SSEA-1, Oct-4, Nanog, e Rex-1 e proteína telomerase.

A terapia miogênica tem como o objetivo transplante de células estaminais para a DMD no intuito de aumentar a expressão de distrofina nas fibras musculares existentes e fornecer uma fonte de células estaminais para a produção de músculos no futuro. Embora os transplantes de CT miogênicas terem sido bem sucedida em camundongos, os transplantes de CT miogênicas alogênicos foram ineficazes em vários testes em humanos (PARKER et al., 2008).

Parker et al. (2008) induziram intolerância imunológica, através do transplante de células hematopoiéticas (HCT), comprovando a presença de 6 - 72% da expressão de distrofina em cães distróficos, além da constatação de um reduzido número de núcleos com localização central e a melhora da estrutura muscular. Vale ressaltar que a expressão da distrofina ficou mantida por menos 24 semanas.

2.8 TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica possui um potencial de tratar diversas doenças genéticas e adquiridas (VERMA; WEITZMAN, 2005). Essa consiste na inserção de material genético exógeno em células de um indivíduo com finalidade terapêutica (CÔCO; WON HAN; SALLUM, 2009).

A transferência tem como objetivo recuperar a função de um gene, atribuir uma nova atividade gênica ou potencializar a atividade dos genes ativos. Com estes objetivos, esta terapia pode ser aplicada tanto para doenças genéticas quanto para adquiridas (MORALES, 2007).

Obstáculos à terapia genética bem-sucedida, são as respostas imunológicas indesejadas aos produtos de substituição ao gene terapêutico. Estudos foram feitos testando as respostas imunológicas para substituição do gene terapêutico, além de analisar a tolerância imunológica mediada por células T de baixa-regulação da resposta imune indesejada (EGHTESAD; MOREL; CLEMENS, 2009).

A terapia gênica envolve a transfecção do transgene nas células alvo, a integração do gene transfectado no genoma recipiente e a expressão deste transgene (VERMA; WEITZMAN, 2005). A eficiência da transfecção, duração da expressão gênica e a inserção correta do transgene, são passos limitantes para o sucesso da terapia. Atualmente, a terapia gênica, vem sendo explorada no tratamento de várias doenças genéticas como a anemia falciforme (OH et al., 2004; PERSONS; TISDALE, 2004), fibrose cística (LEE; MATTHEWS; BLAIR, 2005), DMB e DMD (ROMERO et al., 2004),

síndrome da imunodeficiência severa combinada (SCID) (GINN et al., 2005), o câncer, (SETH, 2005; WIRTH; KUHNEL; KUBICKA, 2005) dentre outras.

A introdução de um gene exógeno pode corrigir um defeito no DNA nas seguintes maneiras, adição gênica: inserção aleatória de um gene funcional ou cDNA nas células patológicas (PERSON; TISDALE, 2004) e *gene targeting*: substituição do gene endógeno por um segmento de DNA exógeno via RH (YANES; PORTER, 1998; LANZOV, 1999). Na adição gênica, mutações podem ser introduzidas devido a inserções randômicas do transgene em certas regiões do genoma como oncogênes ou proto-oncogenes. Várias desvantagens são observadas na adição gênica como: integração aleatória no genoma de múltiplas cópias do vetor e a falta de predileção da expressão do transgene. Já no *gene targeting*, tudo isso é evitado pelo fato do transgene se integrar no seu *locus* natural, assegurando uma transcrição correta.

2.9 GENE TARGETING

Gene targeting tem sido utilizado como uma importante ferramenta na manipulação do genoma e na pesquisa da função gênica. Entende-se como *gene targeting*, um fragmento de DNA exógeno introduzido na célula que irá substituir um segmento endógeno de DNA via RH. Este processo foi descrito em leveduras mais de 25 anos atrás, e variações desta técnica são aplicadas para a avaliação da função gênica neste organismo (ORR-WEAVER; SZOSTAK; ROTHSTEIN, 1981). O gene também foi demonstrado em células de camundongo, e quando aplicado em CT, proporcionou a produção de camundongos mutantes para o estudo da função gênica e para a criação de modelos de doenças genéticas humanas (BRADLEY et al., 1992).

Além das aplicações experimentais, *gene targeting* é a maneira ideal para a terapia gênica, apresentando várias vantagens quando comparada com a adição gênica. Ambos, mutações recessivas como dominantes podem ser corrigidas por *gene targeting* e os riscos associados com a adição gênica podem ser evitados. A terapia gênica por *gene targeting* tem o potencial de corrigir vários defeitos genéticos,

especialmente nos casos de doenças causadas pela mutação em um único gene. Doenças como anemia falciforme, hemofilia, fibrose cística, doença de Huntington e distrofia muscular são potentes alvos para terapia gênica (BRADLEY et al., 1992).

O DNA exógeno transfectado como doador pode se integrar ao genoma no sítio alvo ou aleatoriamente em qualquer cromossomo. Desta maneira, a eficiência dos experimentos que envolvem *gene targeting* depende da relação entre os eventos de integração ilegítima para os eventos de RH (CAPECCHI, 2005).

Trabalhos realizados em vários laboratórios concluíram que a introdução de quebras nas duas fitas do DNA no genoma receptor aumenta a eficiência do *gene targeting* (BIBIKOVA et al., 2001; PORTEUS; BALTIMORE, 2003). Isto pode ser facilmente compreendido. Um fragmento de cromossomo intacto não se beneficia em interagir com outro fragmento de DNA, mas uma quebra na dupla fita do DNA é potencialmente letal e deve ser reparada, sendo uma das vias de reparo pela RH com uma sequência de DNA igual ou semelhante (PORTEUS; BALTIMORE, 2003).

Para manter a integridade genômica, as células devem reparar os danos no DNA com alta fidelidade. Uma das lesões mais perigosas para as células são as quebras na molécula de DNA, pois cada lesão pode potencialmente levar a morte celular ou mutações cancerígenas. Felizmente, as células possuem mecanismos para o reparo de quebras na dupla fita do DNA, entre eles a RH. Este tipo de reparo utiliza um segmento de DNA homólogo não danificado, com a cromátide irmã como molde para copiar a informação perdida. A RH é a forma mais acurada de reparo do DNA, uma vez que a cópia normal do DNA danificado é recuperada (VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANAA, 2001).

A RH exerce um papel vital para a sobrevivência celular e na geração de diversidade genética. O reparo do DNA pela RH é conservativo e não introduz mutações, ao passo que o reparo pela via de recombinação NHEJ introduz inserções ou deleções pequenas para ligar duas extremidades do DNA. Além do reparo da dupla fita de DNA, as células utilizam a RH para criar rearranjos regulados no genoma (MCCORMACK; TJOELKER; THOMPSON, 1991).

Uma via de reparo alternativa é a união das extremidades não homólogas (NHEJ), que liga as extremidades do DNA sem a necessidade de homologia e freqüentemente resulta em pequenas deleções e/ou inserções (CARROLL, 2004).

2.10 MECANISMOS DE SILENCIAMENTO POR RNAi

Em 1998, foi descoberta a interferência por RNA (RNAi), pelos pesquisadores Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver e Craig C. Mello, onde avaliando uma série de dados, resultados e publicações, apontaram para uma hipótese interessante sobre a ação de moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) na célula, dessa forma, promovendo um silenciamento gênico.

Ainda em 1998, Fire et al., aplicaram pela primeira vez, a expressão “interferência por RNA”, em um estudo onde os dsRNAs foram injetados no verme *C. elegans*, promovendo então o silenciamento dos RNAs mensageiros, e dessa maneira, permitiu uma identificação da função gênica.

São usados tanto o termo RNA e RNA de interferência, como mecanismos de silenciamento gênico guiado por moléculas de RNA dupla fita (NAKAYASHIKI, 2005; GRISHOK, 2005; KAVI et al., 2005; LI; DING, 2005; ARAVIN; TUSCHI, 2005; SARMIENTO et al., 2006).

O silenciamento gênico consiste na repressão da expressão de um gene alvo (VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001), pela inibição da transcrição ou pela destruição do transcrito (TANG; GALILI, 2004). O silenciamento por RNA é um mecanismo de regulação da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional que consiste na degradação de uma sequência específica de genes homólogos em resposta a moléculas de dsRNA em plantas, fungos e animais (SARMIENTO et al., 2006; DING; VOINET, 2007; NOWOTNY; YANG, 2009; PADMANABHAN; ZHANG; JIN, 2009; ANGAJI et al., 2010).

A função principal então é regular a expressão gênica, controlando o número de cópias de determinado gene ou, ainda, ser um mecanismo de defesa contra a

superexpressão de transgenes (WASSENEDGER, 2000). O silenciamento parece estar envolvido com a defesa a ácidos nucléicos estranhos, com a proteção do genoma contra a inserção de elementos transponíveis, contra vírus e com a regulação da expressão gênica de famílias multigênicas ou de genes duplicados em plantas (VENDRUSCOLO, 2003; GROENENBOOM; MARÉE; HOGEWEG, 2005).

O silenciamento gênico corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. O RNA está envolvido nos seguintes tipos de silenciamento gênico dependente de homologia (SGDH): (1) PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional), onde a degradação de RNAs homólogos no citoplasma leva a não tradução do gene alvo e (2) TGS (silenciamento gênico transcricional), que está relacionado com o bloqueio na transcrição do gene alvo promovido por metilação na região promotora, a nível nuclear (FAGARD; VAUCHERET, 2000; WASSENEGGER, 2000).

De acordo com Shrey et al. (2009), consiste em duas fases o processo básico de RNAi, sendo elas: a fase de iniciação, e a fase efetora.

A primeira fase, a fase de iniciação, é caracterizada pelas moléculas ativadoras de dsRNA longas que são expressas ou introduzidas no contexto celular. Esses dsRNAs são processados por uma ribonuclease do tipo III denominada DICER ou DICER-LIKE (DCL) que produz, dependendo da isoforma, pequenos RNAs de aproximadamente 21 nucleotídeos, sendo que dois ou três nucleotídeos protuberantes na região 3' e um grupo fosfato na porção 5' que são necessários para a indução do complexo de silenciamento (HAMMOND et al., 2000; BERNSTEIN et al., 2001; TANG et al., 2003, JONES-RHOADES; BARTEL; BARTEL, 2006; PETERS; MEISTER, 2007; SIOMI; SIOMI, 2009; SHREY et al., 2009).

A segunda fase, a fase efetora, os pequenos RNAs de dupla fita (miRNA ou siRNA) são reconhecidos e associados a domínios específicos de uma endonuclease do tipo II denominada Argonaute (AGO2), sendo então incorporados a um complexo multienzimático chamado *RNA induced silencing complex* (RISCs). Uma vez incorporado ao complexo AGO2–RISC, o RNA de dupla fita é desenovelado e somente a fita antisenso de aproximadamente 21 nucleotídeos é mantida no complexo. A fita de RNA antisenso é então usada para guiar o complexo RISC, ativo, à molécula

complementar do mRNA alvo, desencadeando assim o silenciamento (HAMMOND et al., 2000; MAO et al., 2007; KAWAKAMI; HASHIDA, 2007; PETRES; MEISTER, 2007; GREGORY et al., 2008; SIOMI; SIOMI, 2009; JINEK; DOUDNA, 2009; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). Uma importante característica é que a porção 5' da molécula antisenso de um siRNA funcional é termodinamicamente menos estável do que a porção 5' da molécula senso, sendo esse o fator chave para seleção da molécula antisenso como guia pelo complexo RISC. Já a fita senso é clivada por outras proteínas AGO (SHREY et al., 2009).

Numa última etapa, a molécula guia de RNA antisenso é capaz de formar um dúplex com a molécula complementar do mRNA alvo, e em seguida, pela ação da proteína Argonaute (AGO2) presente no RISC ativado, ocorre a clivagem do mRNA homólogo. A especificidade do mecanismo é, portanto, determinada pelas moléculas de RNA antisenso presentes em RISC (HUTVAGNER; SIMARD, 2008; SIOMI; SIOMI, 2009), e que são complementares à molécula de mRNA alvo. Se a complementaridade para tal for perfeita, como ocorre com os siRNAs, a fita de mRNA é clivada rapidamente por AGO2 que reconhece a região 3' desprotegida (AIGNER, 2007; HUTVAGNER; SIMARD, 2008; SIOMI; SIOMI, 2009; SHREY et al., 2009). Se a complementaridade não for perfeita, como acontece com os miRNAs, o complexo AGO2–RISC bloqueia a tradução. A repressão da tradução e a degradação do RNA ocorrem quando as moléculas de RNA guias têm somente complementaridade limitada à região alvo, com o pareamento de bases ocorrendo usualmente na região 3' não traduzida (MATZKE; BIRHLER, 2005; WASSENEGGER, 2005; AIGNER, 2007; HUTVAGNER; SIMARD, 2008; SIOMI; SIOMI, 2009; CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

O RNAi está sendo amplamente aplicado em pesquisas biomédicas, cardíacas e do sistema imune como tratamento para HIV, hepatite viral, doenças cerebrovasculares e cardiovasculares, doenças metabólicas, desordens neurodegenerativas e câncer (ANGAJI et al., 2010).

Das metodologias de silenciamento gênico por RNA dupla fita (dsRNA), a técnica de RNA interferente é a mais eficiente (SMITH, 2000)

Levando em consideração as semelhanças clínicas e patológicas entre cães e humanos DMD(s), foi proposta a utilização destes animais como modelos para a avaliação de novas tecnologias em terapia gênica aliada a terapia celular.

3 OBJETIVOS

Os objetivos foram separados em 3.1 Geral e 3.2 Específicos.

3.1 GERAL

- Promover o uso de células progenitoras oriundas de cães distróficos com vistas à correção gênica, impulsionando o conhecimento e a aplicabilidade da terapia gênica.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente as células progenitoras oriundas de cães distróficos, para a avaliação adequada e coerente de sua correção gênica;
- Produzir fragmentos de RNAi para atenuação da proteína KU 70.
- Promover a atenuação da via de recombinação não homologa através da utilização de RNAi específicos para uma das principais proteínas desta via de recombinação.
- Avaliar a transfecção de DNA em células de medula óssea de cães GRMD por dois métodos distintos: lipofecção e eletroporação/nucleofecção.

4 MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação do comitê de bioética, o trabalho experimental, foi conduzido como descrito no texto abaixo.

4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

Os modelos animais são indispensáveis para o entendimento e sucesso no tratamento de muitas doenças. Sendo assim, utilizaremos os animais do Canil GRMD – Brasil. Para a extração e análise morfológica das CT foram utilizados, sangue do cordão umbilical, placenta de 2 animais recém-nascidos afetados, obtidos de parto normal e medula óssea de cães distróficos, junto ao canil GRMD - Brasil do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DISTROFIA MUSCULAR EM GOLDEN RETRIEVERS POR *RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM* (RFLP)

Extração do DNA genômico.

Para confirmar se as amostras que trabalhamos são de cães afetados, coletamos sangue dos animais, utilizado para a extração do DNA utilizando o KiT GFX (GE). A extração do DNA de sangue foi feita utilizando-se 300 µl de sangue de acordo com instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA foram armazenadas em TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0) a 4 °C.

Amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do fragmento do gene da distrofina (NC_ 006621.2) na região da mutação foram utilizados dois primers localizados no exon 6 (sense) e no íntron 7 (anti-sense) (Quadro 1), produzindo um produto de 310 pares de base(pb).

Região do Gene	Primer (5' → 3')	Sentido	Posição
Exon6	CTTAAGGAATGATGGGCATGGG	S	27881712-27881734
	ATGCATAGTTTCTCTATCATGC	As	27881294-27881316
Intron7			

Quadro 1 - Primers usados para amplificar o segmento da mutação através do PCR. Sendo * S,sense; As, anti-sense

Para cada amostra foi composta uma reação de 25 µl finais para o PCR contendo: 50 ng de DNA, 75 uM dNTPs, 0.35 uM primers, 2.0 U de Taq polimerase em tampão 1X fornecido com a Taq DNA polimerase. O Termociclador (THERMO CYCLER T3000, Biometra) foi programado, usando-se 6 passos; um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos; e mantidas a 4°C.

Após amplificação, as amostras foram analisadas em gel de agarose à 1.5 %, corado com Gel Red e revelado em luz ultravioleta (UV) no Transiluminador.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP foi utilizada para detectar o alelo afetado via digestão enzimática, por meio da enzima de restrição *Sau* 96I. Utilizamos 10 µl do produto amplificado por PCR de 310 pb que foi submetido a digestão com 2 U da enzima *Sau* 96I em volume final de 20 µl. Após 2 horas de incubação a 37°C, as amostras foram analisadas em gel de agarose à 1,5% e coradas em Gel Red e revelados em luz UV.

4.3 LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS

Foram testadas algumas linhagens celulares, que estão separadas em subtópicos, até o estabelecimento de uma única linhagem para dar continuidade ao protocolo, descrito abaixo.

4.3.1 Extração e cultura de células do cordão umbilical

Logo após o nascimento procedeu-se a coleta do sangue de cordão, através da punção da veia umbilical. Neste ato, as amostras coletadas foram divididas em duas alíquotas, uma delas foi colocada em vacountainers de 4 ml com EDTA, e a segunda em eppendorfs, com a mesma solução anticoagulante, para genotipagem dos cães recém nascidos e quantificação dos valores da enzima creatinaquinase (CK).

Das amostras coletadas, antes de se proceder a separação do *pellet* de células brancas, foram feitos esfregaços sanguíneos em lâmina e coloração, para visualização geral das células e estimar a porcentagem de populações de células brancas (*Tripan blue*). Além disso, as células foram analisadas por citometria de fluxo, para quantificação de apoptose celular e porcentagem de populações distintas de células progenitoras com diferentes epítomos de superfície da linhagem CD, no caso CD 34+.

Para o isolamento das células mononucleares, o sangue umbilical coletado foi diluído em PBS (2mM de EDTA) e na solução formada foi adicionado 15 mL de Ficcol-Paque 1077 (Amersham Pharmacia Biotech AB – Uppsala Sweden) para que seja possível a separação das CT CD34+, CD45 e CD117 (linhagens progenitoras com especificidade no mercado para cães), as amostras foram centrifugadas em centrífuga sem freio, para que ocorra a separação das células por gradiente de densidade, no qual as células brancas da camada intermediária (interfase) foram aspiradas com pipeta tipo Pasteur e colocadas em tubos tipo Falcon.

As células aspiradas foram lavadas sucessivamente com solução de PBS (2 mM de EDTA) e receberam adição de 100µl de *FcR Blocking Reagent*, e 100µl *Hapten-Antibody* e a solução foi incubada por 15 minutos à 6 – 12°C, após esse processo, as células foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS, adicionando-se 5 – 10 ml de

tampão por 108 células da solução, após esta etapa ocorreu centrifugação e remoção completa do sobrenadante, ressuspensando o *pellet* em tampão.

A separação magnética foi realizada com separador *VaryMacs* (Miltenyi Biotec) o qual foi regulado de acordo com o número total de células, e a solução completada, lavada com tampão de 500µl ou 300µl de acordo com programa selecionado. As células foram filtradas por uma membrana de *nylon* com poros de 30µm. A coluna do separador removida e colocada em um tubo contendo a mesma solução tampão utilizada na lavagem (MS: 1 ml; LS: 5 ml) para que haja a retirada das células que permaneceram aderidas na malha metálica. Repetida a separação magnética aplicando-se as células diluídas em uma nova coluna pré-lavada, após a nova separação, lavadas e diluídas as células retidas na malha com tampão (MS: 500µl; LS: 2500µl).

4.3.2 Extração e cultura de células das membranas fetais

Os fragmentos obtidos do âmnio e saco vitelino de cães afetados foram mantidos em solução fisiológica nas placas de petri estéreis e posteriormente pressionados em rede tipo Mesh 200 e filtrado em Becker repetidas vezes com solução de PBS à 37°C. Outro procedimento foi a fragmentação geral do tecido com lâmina de bisturi estéril. O cultivo destas linhagens celulares foi realizado em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com renovação do meio a cada 48 ou 72 horas.

Dissociação enzimática das células aderentes: Repique celular

As células derivadas do âmnio e saco vitelino *in vitro*, por apresentarem característica de adesão ao substrato, necessitam sofrer desagregação enzimática, a medida que atingem confluência (80%), para serem transferidas para outra garrafa de cultivo. A dissociação desta teve início com a retirada do meio de cultivo existente na garrafa; estas foram posteriormente lavadas com PBS-L, para a retirada de todo o resíduo do meio de cultivo. Posteriormente adicionou-se 1ml de tripsina a 0,25% permanecendo encubada por 5 minutos a 37°C.

Após este período foi adicionada 5ml de meio de cultivo suplementado com SFB, para a inativação da tripsina; toda suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo tipo Falcon com 5ml de meio de cultivo. Seguidamente os tubos foram centrifugados por 1000rpm a 5 minutos. O *pellet* resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1ml de meio de cultura, para a contagem celular, sendo posteriormente transferidos para garrafas de cultivo com meio de cultivo. As células foram novamente incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37,0°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.3.3 Extração e cultura de células da medula óssea

Os cães distróficos diagnosticados através da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) foram submetidos a anestesia, realizado o preparo dos campos cirúrgicos com assepsia local (Figura 2 A), após feita uma pequena incisão na pele da região pélvica do animal, tomando como base o trocanter maior do fêmur (Figura 2 B), sendo que neste foi introduzido uma espessa agulha (agulha de biópsia para medula óssea / osso) de forma que fosse atingida a medula óssea (Figura 2 C). Logo após, foi realizada a punção da mesma com o auxílio de uma seringa heparinizada (Figura 2 D).

Após a coleta da medula óssea adulta (MOA), a amostra foi levada ao laboratório de cultivo celular para ser processada. Primeiramente, foi realizada a diluição de todo o conteúdo da medula, na proporção de 1:1 em solução salina balanceada pH 7,6. Em seguida, a amostra foi filtrada através de malha mesh, a fim de descartar debris ósseos, tecido adiposo e outros tecidos indesejáveis na cultura (Figura 3 A).

Esta solução foi adicionada lentamente com auxílio de uma pipeta de *pauster*, em um tubo de polipropileno de 15mL previamente preenchido com Ficoll-Paquetm 1077 pela proporção para cada 2 de sangue 1 de Ficoll-Paquetm. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos á 2000 rpm a 20°C, para a obtenção das células mononucleares (Figura 3 B).

O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e transferido para outro tubo de polipropileno com solução de PBS-L (Figura 3 C). As células mononucleares foram submetidas a 2 centrifugações a 1000 rpm, por 7 minutos, a 20 °C, para proporcionar a lavagem celular. O botão celular foi ressuscitado com meio de cultivo e transferido para garrafas de cultivo de 25 cm³ de diâmetro (Figura 3 D). As garrafas foram incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37,0 °C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Após testes com diferentes meios de cultura, foi preconizado o meio que resultou na melhor solução de desenvolvimento, manutenção e expansão das células de medula óssea de cães jovens.

O meio DMEM 1x - High Glucose (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% Soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1% de MEM/NEAA, solução 100x concentrada (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1% de solução de penicilina (10.000u/mL) - Estreptomicina (HyClone).

Isolamento e separação

Após o isolamento das células progenitoras a partir da medula óssea, o processo de expansão celular foi iniciado para a realização dos ensaios de caracterização morfológica, imunofenotipagem e de diferenciação celular. Alíquotas de 5x10⁵ das células progenitoras foram diluídas em 1ml de meio de cultivo, sendo posteriormente transferidas para uma garrafas de polipropileno de 75 cm³ que foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia óptica e o meio trocado de 2 a 3 dias, de acordo com a necessidade da cultura.

Figura 2 - Em A, região do trocanter do fêmur após colocar de panos de campo esterilizados, e assepsia do local. Em B, início da incisão cutânea, acima do trocanter do fêmur. Em C, agulha calibrosa em direção à região medular do osso fêmur. Em D, coleta da medula óssea, em seringa heparinizada

Figura 3 - Em A, filtragem da amostra em malha mesh; Em B, amostra após centrifugação com Ficoll; Em C, coleta da camada mononuclear; Em D, células plaqueadas nas garrafas de cultivo

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

Uma vez que determinamos o tipo de célula que trabalharemos, as células de medula óssea de cães jovens (4-8 meses) GRMD, as identificamos realizando curva de crescimento, citometria de fluxo e caracterização das mesmas, como mostra os protocolos a seguir.

4.4.1 Protocolo da curva de crescimento

A capacidade de proliferação *in vitro* das células isoladas da medula óssea dos cães jovens (4 a 8 meses de idade) de GRMD foram avaliadas através da curva de crescimento celular. As células foram cultivadas em garrafas 25cm³ com meio basal atingindo confluência de aproximadamente 75%, neste ponto, foram tripsinizadas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer, estas células foram então replaqueadas, em duplicata, sob a densidade de $2,5 \times 10^5$ células em novas garrafas 25 cm³. A cada 48 horas, elas foram novamente tripsinizadas, contadas e replaqueadas. Este processo se inicia a partir da passagem dois (P2) até se finalizar na passagem 11 (P11).

4.4.2 Citometria de fluxo

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tripsinizadas e inativadas com soro fetal bovino, colocada em tubos de 15 mL em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e luz UV durante 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado à 1500 rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e ressuspendido em 5 mL de solução salina 0,9% para lavagem, centrifugado à 1500 rpm

durante 10 minutos. Após a centrifugação foi descartado novamente o sobrenadante e acrescentado o tampão FACS Flow, a suspensão foi transferida para tubos de citometria, e adicionados os anticorpos CD34, CD45, CD105, STRO-1, OCT3/4 (Quadro 2) e foram incubados por 2 horas a 4°C logo após foi adicionado o anticorpo secundário (Quadro 3). As análises de expressão foram realizadas em Citometro de Fluxo FACScalibur, 10.000 eventos e as aquisições analisadas pelo programa Cell Quest Pro.

A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo FITC inespecífico. Para a avaliação da expressão de anticorpos citoplasmáticos e nucleares Oct3/4 e Stro-1, as células foram permeabilizadas previamente com 10µl de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos.

OCT 3/4: determinante de CTE e germinativas, é um fator de transcrição envolvido na regulação da supressão de genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência.

STRO-1: Marcador de superfície expresso em CTMs.

CD34: Expressa em células endoteliais e células progenitoras hematopoiéticas.

CD45: Marcador de células hematopoiéticas.

CD105 ou endoglina: Expresso na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo esquelética.

Anticorpo	Espécies que reagem	Empresas
Stro 1 (sc47733)	Humano	Santa cruz Biotechnology
Oct3/4 (sc5279)	Camundongo, rato, humano	Santa cruz Biotechnology
CD105 (SC-18838)	Humano, camundongo	Santa cruz Biotechnology
CD34 (FAB3346P)	Cão	R&D Systems
CD45 (C7556)	Humano	Sigma

Quadro 2 - Anticorpos primários utilizados para a caracterização das células progenitoras mesenquimais da medula óssea

Anticorpo	Espécie	Empresa
Alexa Fluor 488	Mouse anti-goat	Invitrogen

Quadro 3 - Anticorpo secundário utilizados para a caracterização das células progenitoras da medula óssea através da citometria de fluxo

4.4.3 Caracterização das células tronco

Para caracterizar nossas células, seguimos os seguintes protocolos de diferenciação.

4.4.3.1 Diferenciação osteogênica

Cerca de 5×10^3 de células isoladas a partir da MOA de cães jovens distróficos, foram cultivadas em placas de 6 wells. Após 24 horas, o meio basal foi substituído pelo meio de diferenciação DMEM-Low Glicose (DMEM-LG) suplementado com 2% de soro Knockout (Gibco), 1% Penicilina/Streptomicina e com os indutores osteogênicos (100 μ M dexametasona e 50 μ M de 2-fosfato ácido ascórbico, todos da Sigma-Aldrich). As trocas de meio foram realizadas a cada três dias, de acordo com as necessidades observadas diariamente. A cultura controle foi mantida com DMEM-LG, 2% de soro Knockout, 50 μ M de 2-fosfato ácido ascórbico e 1% de Penicilina/ Estreptomicina. No décimo dia da diferenciação, ambos os meios da cultura (experimental e controle) foram refeitos sendo suplementados com 200mM de β -Glicerolfosfato. Após 21 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas pela coloração de *von Kossa*, para determinar a deposição mineral de acordo como descrito por Lennon et al. (1996).

4.4.3.2 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, cerca de 8×10^4 células/mL foram centrifugadas em tubo de polietileno a 300x g. O meio para diferenciação foi composto por DMEM-HG, com 1% soro fetal bovino (Hyclone), 6.25 μ M insulina, 10 ng/ml TGF- β 1 e 1% penicilina. A troca do meio indutor foi realizada todos os dias e mantido por 21 dias. Após este período, as amostras foram fixadas a temperatura ambiente com paraformaldeído 4% e então seccionadas com o auxílio de um micrótomo. As lâminas foram então preparadas, e submetidas à coloração Tricoma de Masson.

4.5 PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO PEGFP-N1

O plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech®, EUA) (Figura 4) foi clonado e extraído de bactérias *E. Coli* da cepa DH10B, previamente competentes por soluções de NaCl_2 e MgCl_2 , transformadas por eletroporação e semeadas em placas contendo meio Luria Bertani (LB-Ágar) contendo 50 μ g/mL do antibiótico canamicina. A inserção do pEGFP-N1 à bactéria garante resistência a esse determinado antibiótico, o que possibilita o crescimento e seleção apenas de bactérias transformadas.

Em 5ml de meio (LB Calda) contendo 50 μ g/mL de canamicina, uma colônia de DH10B selecionada da placa foi cultivada, por aproximadamente 16 horas, em shaker a 37°C, sendo que esse pré-inóculo foi transferido para 50ml de meio LB adicionado de 50 μ g/mL de canamicina e cultivado por 16 horas, nas mesmas condições citadas acima. Após esse período, o pEGFP foi purificado utilizando o kit *Hi Pure Plasmid Midiprep* (Invitrogen®, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e, logo após, foi confirmada e validada a sua integridade através da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 5).

No passo seguinte, esse plasmídeo foi linearizado com a enzima de restrição *Afl*I e purificado por precipitação com etanol, estando desta maneira pronto para a transfecção celular. Após, esse processo foi utilizado para a transfecção das CTMs provenientes da MOA de cães distróficos.

Figura 4 - Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do pEGFP-N1 circular e o ponto de restrição onde a enzima de restrição *Afl*II cliva. Fonte GenBank Accession #U55762

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose à 1%. (1) Marcador 1Kb; (2) 4 µl de pEGFP circular; (3) 4 µl de pEGFP linearizado após clivagem com a enzima *Afl*III

4.6 TRANSFEÇÃO DO DNA PLASMIDIAL NAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA CANINA.

Nesta etapa buscamos avaliar a eficiência da transfecção das CTMs da MOA, para tanto foi utilizado um vetor de DNA circular e outro linear, que expressam o gene marcador pEGFP-N1 (*green fluorescen protein*), visando otimizar o protocolo de transfecção para estas células. Foram utilizadas duas formas distintas de transfecção, através da lipofecção e da nucleofecção.

4.6.1 Transfecção do vetor pEGFP por lipofectamina

Um dia antes da transfecção, foram plaqueadas 2×10^5 células em 500 µl de meio de cultura sem antibióticos, no momento da transfecção as células tinham 90% de confluência. Tanto para o pEGFP circular quanto o pEGFP linear foi usado 1,6 µg do mesmo. Em cada amostra de transfecção, utilizamos 15 µl de Opti-MEM[®] I Meio com Soro Reduzido sem adição de soro fetal bovino para diluir o DNA e a amostra foi homogeneizada. Diluída a quantidade adequada de Lipofectamine[™] 2000 em 15 µl de Opti-MEM[®] I Meio e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. O DNA diluído foi misturado com a Lipofectamina[™] 2000, totalizando 30 µl de volume total, e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente.

Adicionado 30 µl de complexos a cada poço contendo células, incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por 4 horas. Após as 4 horas de incubação foi adicionado 500 µl de meio

4.6.2 Transfecção das células por Eletroporação

Para a transfecção com o Nucleofector[®] (Lonza[®], Alemanha) de CTMs de MOA, utilizamos 500 mil células em duplicata, com o kit *Basic Mesenchymal Stem Cell* (VPE-1001), para o pEGFP circular foi usado o programa G-017; para o pEGFP linear foram usados os programas U-023 e G-017. Com esse método pretendeu-se avaliar qual o programa que proporcionaria os melhores resultados com o pEGFP linear, tanto de sobrevivência celular, quanto da transfecção.

Foram utilizados 7 µg de pEGFP para 5×10^5 células, em cada amostra. A solução Humans MSC Solution Nucleofector (Lonza[®]), foi à temperatura ambiente, e uma alíquota de meio de cultura pré-aquecido a 37°C em um tubo de 50 mL (sendo 500 µL por amostra). As células distribuídas em placas de 6 poços, com 1ml de meio de cultura pré-estabilizado em estufa a 37°C com 5% CO₂.

Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS (Tampão fosfato salino). Em seguida, as células foram tripsinizadas com tripsina EDTA (Nutricell) a ponto que uma quantidade superior a 90% estivessem desprendidas da placa de cultivo e, então, adicionado DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% para inativar a ação da tripsina. As células então foram removidas da garrafa e foi realizada a contagem. para determinar a concentração celular. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. Foram recuperadas por centrifugação 5×10^5 células utilizadas como amostra de nucleofecção

Ressuspendido o *pellet* numa concentração final de 5×10^5 células com 100 µL da solução Humans MSC Solution Nucleofector em temperatura ambiente Misturada 100µl da suspensão celular com 7 µg de DNA. Transferida para a cubeta de nucleofecção e posteriormente os programas G-017 e U-023 foram selecionados .

Em seguida as células foram removidas da cubeta adicionando 200 µL de DMEM e transferidas para placas de cultivos de 6 poços, mantidas em cultivo em estufa a 37°C e 5 % de CO₂

4.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR DOADOR.

Para a construção do vetor, utilizamos o seguinte protocolo.

4.7.1 Extração de DNA genômico

Foram utilizadas amostras de cães não distróficos da raça Golden Retriever do canil da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP) para extração de DNA genômico para construção vetor doador. A extração foi realizada utilizando-se o Kit Purelink[™] Genomic DNA (Invitrogen) em 200µL de amostra sanguínea, de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.2 Amplificação de um fragmento do DNA genômico

Duas regiões adjacentes ao sítio da mutação no gene da distrofina canina foram amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR). Tais fragmentos são referentes ao braço direito (BD) e ao braço esquerdo (BE) do vetor doador final. Sendo assim nomeados devido aos seus posicionamentos no vetor linearizado (Figura 6)

Figura 6 - Representação esquemática do vetor doador final linearizado

Os primers (iniciadores) utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA homólogos ao gene da Distrofina (GenBank id:606758) que serviram para a construção do vetor doador estão descritos no quadro 4, com os respectivos sítios para enzimas de restrição na região 5'.

Gene Alvo	Sentido	Primers (5' → 3')	Enzima de Restrição
Braço Direito (1380 pb)	S	5' TACGTAT TGGAGAAGCAGTGT CAGTGG 3'	SnaBI
	As	5' TTATGCTAGC CCTAACACACCGGCAGAAAT 3'	NheI
Braço Esquerdo (1073 pb)	S	5' GCGGCCGCT TGGGGATGAATACCAGAAGC 3'	NotI
	As	5' TTATCACTCAGTG ACAGTGCTGCCTGTCAACTG 3'	DraIII

Quadro 4 - Descrição dos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos referentes ao braço direito e ao braço esquerdo. S, sense; As, anti-sense

A reação de amplificação dos fragmentos de DNA, ou reação em cadeia da polimerase (PCR) foi composta por 1 µL de DNA genômico do cão não distrófico (40-100 ng/µL); 1 mM de dNTPs; 1X de Tampão de Reação; 1 µM de cada iniciador e 1U de Taq Polimerase. Foi realizado gradiente de concentração de MgCl₂ (1,5 mM – 4 mM) para determinação da melhor condição para amplificação, sendo a concentração ideal observada de 3,5 mM. Todas as reações foram realizadas com um volume final de 10 µL.

Para a amplificação do BD foi realizado gradiente de temperatura de anelamento (55°C – 65°C) para otimização das condições de reação. Os ciclos de amplificação foram compostos da seguinte maneira: desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C (BE) ou 65°C (BD) por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Por fim foi realizada uma extensão a 72°C por 7 minutos.

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e fotografadas sob luz UV utilizando o fotodocumentador FluorChem[®]FC2 (AlphaInnotech). Os produtos amplificados foram extraídos e purificados do gel utilizando-se o Kit illustraGFX PCR DNA and GelBand Purification (GEHealthcare), conforme as instruções do fabricante.

4.7.3 Clonagem do BD no vetor pCR[™] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen)

Os produtos da amplificação correspondentes ao BD e BE foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) separadamente. As reações de ligação foram compostas de 5,5 µL de produto PCR e 0,5 µL do vetor pCR[™] 2.1-TOPO[®], incubados a temperatura ambiente por 16 horas.

Bactérias DH5α eletrocompetentes foram transformadas com as reações de ligações do vetor TOPO contendo o BD através de eletroporação com o programa “Bacterial Program 2” do aparelho Nucleofector (Lonza, Alemanha) sendo transformados 4 µL da reação de ligação para 30 µL de bactérias. Após transfecção, adicionaram-se 100 µL de S.O.C. (invitrogen) e todo volume foi distribuído em placas de LB ágar contendo 50µg/mL de ampicilina, além de Xgal e IPTG para seleção de colônias brancas/azuis. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Para confirmação da ligação do inserto ao vetor TOPO TA, foi realizada PCR de colônias selecionadas randomicamente, utilizando-se os primers RR4 e RL3 para detecção de fragmentos correspondentes ao BD. Os ciclos de amplificação foram compostos por desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de 95°C

por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 2 minutos. Por fim foi realizada uma extensão a 72°C por 10 minutos.

As colônias contendo as construções foram inoculadas em 500 mL de LB com ampicilina (50 µg/mL) para a extração do DNA plasmidial utilizando-se o Kit Midi Prep (Illustra™ plasmidPrep Midi Flow Kit- GEHealthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA plasmidial referente a construção TOPO + BD foi digerido usando as enzimas de restrição *FastDigest* SnaBI (Fermentas) (5'TACGTA3') e *FastDigest* NheI (Fermentas) (5'GCTAGC3') que possuem sítios de ação nos primers RL3 e RR4 respectivamente. Para a reação de digestão foram utilizados 1 µg de DNA, 1U de cada enzima e 1X do tampão de reação. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C.

A confirmação da digestão se deu pela visualização, no gel de agarose a 2%, de duas bandas, uma referente ao braço direito, com 1334 pb e outra referente ao vetor TOPO, com 4 Kb. As bandas referentes ao braço foi, então, purificada usando illustraGFX PCR DNA and Gel Band Purification (GEHealthcare).

4.8 PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA INTERFERÊNCIA (RNAI)

Para amplificação do DNA gênomico previamente confirmado como gene normal da distrofina por PCR/RFLP. O RNAi foi construído com base no segmento da Ku70 em humanos (BERTOLINI et al., 2009) onde foi comparado a sequência mais similar na espécie canina no banco de dados NCBI, a sequência correspondida foi a seguinte: 188 pb no exon 5 a partir da posição sequência 351-538; GenBank. XM531714.2. Para tanto foram utilizados os iniciadores Ku70 Exon 5 R (5'-CATTGGTGAACAGCATGATCC) e ku70 Exon 5 F (5' TAATCCAGGTGCTAAA CGAGTGC). A PCR foi realizada com volume final de 50µl, contendo 5 µl de tampão 10X, 2 µl de MgCl₂, 1 µl de cada iniciador, 1 µl de dNTP 10mM e 0,3 µl de Platinum® Taq DNA polimerase, sendo o volume remanescente completado com 39,7 µl água deionizada estéril. O programa de amplificação foi conduzido como segue:

desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; dois ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 58°C por 30 segundos e 35 ciclos de desnaturação a 72°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 7 minutos; e um ciclo de extensão final a 4°C. Controles negativos sem a presença de DNA foram submetidos à amplificação simultaneamente, bem como uma amostra de um cão normal foi incluída para se testar a especificidade do teste. O tamanho estimado do amplificado era de aproximadamente 188 pb da Ku70 Exon 5.

Após a amplificação acima descrita, o produto final da PCR foi colocado numa superfície com gelo. Dando continuidade ao protocolo de análise das amostras, 4 µl do produto de PCR, Loading Dye 1 µl, 5 µl de água, totalizando um volume de 10 µl, foi colocado em gel de agarose 1.5%, para eletroforese (THERMO SCIENTIFIC D3-14), com a finalidade de verificar a integridade do produto de PCR e fotografada sob luz UV utilizando-se o fotodocumentador (FLUORCHEM FC2 MULTILMAGE-ALFHAINNOTECH).

Reação de ligação T7

Após a amplificação do segmento exon 5 do DNA genômico, realizamos a reação TOPO[®] Linking com os kits comerciais block-iT[™] T7-TOPO Linker e Block-iT RNAi Purification kit (Invitrogen[®]), seguindo instruções do fabricante.

Para obtermos um volume total de 6 µl, misturamos as substâncias e incubamos por 15 minutos a 37°C, 1 µl do produto exon 5 da PCR, 1 µl de solução de sal, 3 µl de água estéril e 1 µl do BLOCK-iT[™] T7-TOPO[®] 1 ml Linker após incubação, a reação foi colocada no gelo.

Segunda reação de Amplificação sense e antisense:

Foi retirado 1 µl do volume total de 6 µl dessa reação de ligação – T7, para ser usada na Segunda Reação de Amplificação, onde se divide as amostras em SENSE e ANTISENSE.

Para esse DNA linear foi utilizado 1 µl do volume total de 6 µl, a fim de produzir os transcritos de fita simples de RNA (ssRNA), as fitas “sense” e “antisense”.

As reações foram então preparadas segundo o fabricante (Quadro 5):

Reagentes	Sense	Antisense
H ₂ O	41,25 µl	41,25 µl
dNTPS 10Mm	1 µl	1 µl
Primer (F) Gene Específico (10 µM)	_____	0,5 µl
Primer (R) Gene Específico (10 µM)	0,5 µl	_____
Tampão 10x	5 µl	5 µl
Mg	2 µl	2 µl
Primer (75ng/ µl)	1 µl	1 µl
Reação de ligação-T7	1 µl	1 µl
Platinum ® Taq DNA	0,25 µl	0,25 µl

Quadro 5 – Reagentes utilizados para amplificação

Para a amplificação utilizamos o programa de amplificação iniciando com desnaturação a 95°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; dois ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e 35 ciclos de desnaturação a 72°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 7 minutos; e um ciclo de extensão final a 4°C.

A quantificação das fitas “sense” e “antisense” de DNA, pelo espectrofotômetro (EVOLUTION 300 UV-VIS, THERMO SCIENTIFIC®) foi: fita sense 36ng/µl e fita antisense 32ng/µl.

Reação de Transcrição

A transcrição foi realizada a fim de produzir dupla fita de RNA (dsRNA). As adições dos reagentes, foram colocadas em dois tubos estéreis de 0,5ml (um para SENSE e outro para ANTISENSE), obedecendo a seguinte ordem: água livre de RNase 12 µl, Dntp 75mM 8 µl, DNA 2 µl, 10x Transcription buffer 4 µl, Block – iT T7 Enzyme Mix 6 µl, totalizando 30 µl. Essa solução foi mantida por 4 horas a 37°C em banho Maria e então foi adicionado 2 µl de DNase I em tubo estéril e novamente colocada em banho Maria por 15 minutos, a 37° C.

Purificação do RNA transcrito

Para o procedimento de purificação das ssRNA, cada reação de transcrição de RNA contendo 40 µl, recebeu 160 µl de RNA Binding Buffer contendo 1% (v/v) de Beta – mercaptoetanol seguido de 100 µl de Etanol 100%, obtendo volume final homogêneo de 300 µl. A seguir a amostra foi aplicada para o cartucho de rotação RNA, centrifugada a 14000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente e o escoamento foi descartado. Para a lavagem da amostra, repetimos essa operação duas vezes com 500 µL de tampão 1X e novamente o escoamento foi descartado. Após, a fim de secar o *pellet*, o tubo foi centrifugado novamente em rotação de 14.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente e então colocado em um Tubo RNA Recovery.

Foi adicionado 40 µl de água livre de RNase para o cartucho de rotação RNA presente no tubo Recovery. Após 1 minuto em temperatura ambiente, foi centrifugado em rotação de 14000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente para eluição do ssRNA. Eluímos a ssRNA com 40 µl de água livre de RNase, totalizando 40 µl de volume final para sense e 40 µl de volume final para antisense, e armazenadas a -80°C.

As fitas “sense” e “antisense” de ssRNA transcritas foram quantificadas pelo espectrofotômetro (EVOLUTION 300 UV-VIS, THERMO SCIENTIFIC®), sendo elas: sense 150ng/µl, antisense 140ng/µl, a fim de produzir dupla fita de RNA (dsRNA)

Gerando dsRNA

Para o anelamento quantidades iguais das amostras sense e antisense transcritas, foram colocadas em tubo estéril livre de RNase, no gelo. Em um Becker, 250ml de água previamente fervida no microondas, e então o tubo contendo as amostras de sense e antisense transcritas foi colocado em uma bóia no Becker, as amostras ficaram então em temperatura ambiente entre 1 e 1 hora e meia, para o anelamento da ssRNA. Para confirmar o anelamento 4 µl da amostra dsRNA, Loading Dye 1 µl, 5 µl de água livre de RNases, totalizando um volume de 10 µl, foi colocado em gel de agarose 1.2%. E então a amostra foi estocada a – 80°C.

Podemos esquematizar o processo desde o T7 até a obtenção da dsRNA, com a figura abaixo (Figura 7), fornecida pelo BLOCK-iT™ RNAi TOPO sistema de transcrição®.

Figura 7 - Diagrama do Sistema. Processo de ligação, amplificação, transcrição, purificação e anelamento para geração da dupla fita de RNA

Produção siRNA pela enzima *Dicer*.

A reação de 150 µl finais com Enzima *Dicer*, foi preparada no gelo, na seguinte ordem: 15 µl de 10x *Dicer* Buffer, 14 µl de água livre de RNase, 115 µl dsRNA Purificado, 6 µl Block – iT *Dicer* Enzyme (1U/µl), totalizando 150 µl de volume final. A reação homogênea, foi incubada por 14-18 horas a 37°C e então adicionado 6 µl de 50x *Dicer* Stop Solution na reação. Para verificar se houve uma quebra da sequência do dsRNA, 4 µl da amostra dsRNA, Loading Dye 1 µl, 5 µl de água livre de RNases, totalizando um volume de 10 µl, foi colocado em um poço de gel de agarose 4%, em outro poço de Gel de agarose 4%, 4 µl da amostra d-siRNA, Loading Dye 1 µl, 5 µl de água livre de RNases, totalizando um volume de 10 µl, para verificar se o substrato de dsRNA foi clivado. O d-siRNA foi armazenado a -20°C "Overnight".

Procedimento de purificação d-siRNA

A última etapa da construção do RNAi, compreendeu a purificação dos pequenos fragmentos clivados pela enzima *Dicer* (d-siRNA), da seguinte maneira: cada reação da

Enzima Dicer (volume ~ 150µl) recebeu 150 µl de RNA Binding Buffer contendo 1% (v/v) de Beta - mercaptoetanol, seguido de 150 µl isopropanol, para obter um volume final de 450 µl bem homogêneo. Metade da amostra (aproximadamente 225 µl) foi colocada no cartucho RNA de rotação para centrifugar a 14000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o cartucho RNA foi transferido para o Tubo de coleta siRNA. Essa operação foi repetida com a outra metade da amostra (aproximadamente 225 µl).

Foi feita a transferência dos dois precipitados, totalizando aproximadamente 450 µl de volume final, e então adicionado 300 µl de isopropanol, totalizando 750 µl finais e homogeneizados. 1/3 da amostra (aproximadamente 250 µl) foi passada para um novo cartucho RNA de rotação e centrifugado a 14000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente, e o escoamento foi descartado, e então, essa etapa foi repetida para as outras duas partes do volume.

Feita a lavagem duas vezes, com 250 µl de tampão 1X no cartucho RNA de rotação contendo o d-siRNA, centrifugado a 14000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente e descartado o escoamento. Para retirada de resíduo do tampão, foi centrifugado apenas o cartucho RNA de rotação a 14000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi colocada então no tubo Recovery e foi adicionado 15 µl de água livre de RNase novamente no cartucho RNA de rotação por 1 minuto à temperatura ambiente, e então centrifugado a 14000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente para eluição do d-siRNA com 30 µl, a concentração final de 130 ng/µl e então estocado a – 80°C.

4.9 TRANSFECCÃO DO RNAI

A transfecção foi feita através da lipofetamina.

4.9.1 Transfecção por lipofetamina

As CTMs oriundas da MOA de cães GRMD, quando estavam na segunda passagem (P2) foram descongeladas e colocadas em cultivo. O criotubo contendo essas células foi retirado do freezer -80°C e transferido para Becker com água destilada a 37°C até a completa descongelação, por aproximadamente 5 minutos.

Ao meio de congelamento (D-MEM, antibiótico, 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO) foram adicionados 5 mL do meio de cultivo (D-MEM, 10% de SFB), em seguida, foi feita centrifugação a 1200 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e dessa forma, separado o precipitado celular. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL do meio de cultivo, e então as células foram transferidas para garrafa de cultivo celular de 75cm³ e mantidas em estufa úmida a 37°C a 5 % de CO₂.

Após 24 horas de cultivo, na primeira análise foi possível verificar um bom crescimento celular, no entanto, havia muitas células mortas que foram removidas com a substituição do meio de cultivo. Com 48 horas de cultivo, o meio de cultivo foi removido e as células aderidas ao fundo da placa lavadas com PBS (Nutricell) e então tripsinizadas.

Para análise do siRNA, as células tripsinizadas, foram distribuídas para que o teste fosse realizado em triplicata numa placa de 96 poços, numa confluência de 20 %, ou seja, aproximadamente 20000 células por poço, mantidas em meio de cultivo sem antibiótico, a 37°C e 5 % de CO₂. Após 24 horas, o cultivo celular com 40 % de confluência foi mantido até ser utilizado o siRNA.

siRNA Transfecção

Para a análise da interferência do RNA foram preparados 10 pmol e 20 pmol, do produto da *Dicer*, respectivamente, em 25 µL de Opti-MEM® I *Reduced Serum Medium* sem soro – para que a concentração de RNA quando adicionada as células fosse de 33 nM, logo após a solução foi homogeneizada gentilmente.

A LipofectaminaTM 2000, foi homogeneizada gentilmente, e então diluída 0,25 µL em 25 µL Opti-MEM® I *Reduced Serum Medium*. A solução foi misturada gentilmente e

incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período de incubação, foi adicionado o Opti-MEM com siRNA ao Opti-MEM com Lipofectamina, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. Ao cultivo celular foi adicionado 50 µL por poço dessa mistura, que ficou em contato com as células por seis horas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂, posteriormente houve a substituição por meio de cultivo e a placa retornou a estufa.

As células foram coletadas em triplicata para análise da expressão por Real Time PCR, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas a 10pmol e 48 e 96 horas a 20pmol.

4.10 PCR-RT

O isolamento do RNA total foi realizado utilizando-se kit de purificação com Trizol de acordo com as instruções do fabricante. Antes da transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas por 5 minutos a 70°C e resfriadas em gelo. A transcrição reversa foi então realizada em um volume total de 20 µl, o qual compreendia 10 µl da amostra de RNA, 4 µl de tampão 5X de transcriptase reversa, 8 unidades de RNaseout, 150 unidades de transcriptase reversa Superscript III, 0,036 U de *primers* aleatórios, 10 mM de DTT, e 0,5 mM de cada dNTP. A mistura foi incubada por 1 h a 42°C, por 5 minutos a 80°C e armazenadas a -20°C. Controles negativos foram preparados sob as mesmas condições, mas sem a inclusão da transcriptase reversa. Os *primers* e produtos utilizados desde o isolamento do RNA total até a transcrição reversa foram adquiridos da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

A quantificação do RNAm para KU70-EXON 5 foi realizada utilizando-se SYBR Green. As reações de PCR foram compostas de 1 µl de DNAc como molde em 7,5 µl de SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 5,5 µl de água ultra pura e 0,5 µM de cada primer. Os *primers* foram desenhados para realizar a amplificação de RNAm para KU70-EXON 5, GAPDH e β-actina (Quadro 6), sendo os dois últimos utilizados como controles endógenos para normalização da expressão gênica. A estabilidade da expressão dos genes controle foi analisada pelo software

BestKeeper (Pfaffl et al. 2004), que identificou o GAPDH como gene de referência com a menor variação geral.

Gene alvo	Primer (5' → 3')	Sentido	Posição	Código de acesso GenBank	de no
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	S	287-309	GI:27525390	
	ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	As	440-462		
β-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	S	187-209	GI:28628620	
	TCCTTGATGTACGGACGATTTCC	As	386-410		
KU70-EXON5	TAATCCAGGTGCTAAACGAGTGC	S	351-374	XM531714.2.	
	CATTGGTGAACAGCATGATCC	As	517-538		

Quadro 6 - Primers usados para a análise de PCR quantitativo. S,senso; As, anti-senso

O perfil do ciclo para a primeira etapa do PCR foi: desnaturação inicial e ativação da polimerase por 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a 72°C. Todas as reações foram realizadas em um equipamento de PCR em tempo real Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, CA, EUA). O método do delta-delta-CT (Livak & Schmittgen, 2001) foi utilizado para transformar os valores de CT em níveis normalizados de expressão relativa.

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos da seguinte maneira: 5.1 Linhagens de células progenitoras, 5.2 Seqüenciamento do fragmento gênico mutante responsável pela distrofia muscular, 5.3 Preparação do plasmídeo pEGFP-N1, 5.4 Mapa de restrição do gene GRMD e construção do vetor, 5.5 Transfecção, 5.6 Construção do RNAi

5.1 LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS

Os resultados das células referidas nos tópicos 5.1.1 e 5.1.2 abaixo são resultantes do Projeto Jovem Pesquisador “Interação de terapia celular e gênica para a correção da distrofia muscular de Duchenne utilizando endonucleases quiméricas”, processo nº 2007/51222-2 do Professor e Orientador Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

5.1.1 Extração e cultura de células do cordão umbilical

Estes tipos celulares se mostraram pouco expansivos em cultivo gerando quantidades inapropriadas para correção gênica, e também apresentaram uma capacidade de diferenciação celular muito limitada, sendo diferenciadas apenas em linhagem celular osteogênica.

5.1.2 Extração e cultura de células das membranas fetais

Saco vitelino

Morfologicamente as células com aparência mesenquimal eram heterogêneas, em geral são fusiformes, possuindo o núcleo reduzido.

A expressão do anticorpo Oct-4 foi observada em diferentes tipos celulares derivados do saco vitelino *in vitro*. Para o anticorpo vimentina, células fibroblastoídes fusiformes e células fibroblastoídes grandes com projeções citoplasmáticas, demonstraram-se citoplasma-positivo ao realizar as reações de imunocitofluorescência.

Âmnio

Estas células mostraram um excelente potencial de diferenciação totipotente, mas análise de testes carcinogênicos evidenciaram que estas não poderiam ser usadas a priori em testes pré-clínicos devido sua capacidade de geração tumoral, o que contradiz a literatura quando se estuda as células tronco amnióticas humanas.

5.1.3 Extração e cultura de células da medula óssea

As células mesenquimais obtidas do sangue de cordão umbilical apresentam vantagens, por serem coletadas durante o nascimento, sem necessidade de sedação ou anestesia para o seu procedimento, nem analgesia após a coleta. Não havendo danos ao recém nascido durante a obtenção do sangue (PARK et al., 2006; LU et al., 2006). Essa vantagem também é característica das células oriundas das membranas fetais. A desvantagem dessas células (cordão umbilical, membranas fetais) em relação às da medula óssea, são exatamente o momento em que podem ser extraídas, ou seja, no momento imediato pós-parto. Uma vez que, em muitos casos de doenças genéticas, como a distrofia muscular, o diagnóstico é tardio ao nascimento, impossibilitando o uso dessas células acima citadas e já estudadas. Dessa forma, visando o tratamento de todos aqueles afetados por estas patologias genéticas, julgamos que as células da MOA, é uma excelente fonte de estudo e uma nova ferramenta para futuras terapias celulares e gênicas.

As características primárias das células cultivadas no meio já descrito na metodologia foram de células mononucleares nos primeiros dias de cultivo, com a presença de inúmeras células nucleadas não-aderentes a placa de cultivo. Após 4 dias de cultivo, o meio foi trocado, de forma que as células flutuantes e os debris fossem descartados, restando populações de células aderentes a placa de cultivo, ainda com pouco debris celular (Figura 8 A). Com 10 dias de cultivo, apenas trocando o meio a cada 2 dias, formação de colônia e característica fibroblastóide (Figura 8 B).

As células aderentes MOA de cães jovens distróficos, na primeira passagem, eram pequenas, com formato fusiforme, alongadas e com uma membrana citoplasmática freqüentemente regular. Após 20 dias em cultivo, as células estavam na terceira passagem (P3) e apresentavam-se com características semelhantes a fibroblastos, formando uma população celular homogênea, com confluência de aproximadamente 70% (Figura 9).

Figura 8 - Em A, fotomicrografia de poucas células aderidas em 4 dias de cultivo, com presença de debris celulares (aumento de 4x); Em B, fotomicrografia de células fibroblastóides, com formação de colônia, em 10 dias de cultivo (aumento de 4x)

Figura 9 - Fotomicrografia das células fibroblastóides aderidas a placa de cultivo, na P3, com confluência 70%. Em A aumento de 4x, em B aumento de 10x, em C aumento de 20x e em D aumento de 40x

5.1.3.1 Curvas de crescimento

Além das células da MOA de cães distróficos adultos (3 anos), estudamos as células da MOA de cães distróficos jovens (entre 4 e 8 meses de idade), seguimos o mesmo protocolo de coleta e observamos diferença, quando comparado a medula óssea dos cães adultos, na curva de crescimento. A curva de crescimento nos cães adultos, não ultrapassou a terceira passagem (P3), característica essa, indesejável para o cultivo celular. A curva de crescimento nos cães jovens foi maior, obtendo maiores passagens, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1 – Curva de crescimento das células da MOA de cães jovens

5.1.3.2 Citometria de fluxo

As células progenitoras da medula óssea isoladas da MOA de cães jovens GRMD foram submetidas a técnica de citometria de fluxo com os seguintes anticorpos: CD34, CD45, CD105, STRO-1, OCT3/4, os histogramas estão representados na figura 10.

Dentre os marcadores enumerados acima as células foram positivas para todos os anticorpos, com porcentagens diferentes, CD34, 54,20%; CD45, 46,45%; CD105 54,75%; STRO-1, 50,45%; OCT3/4, 75,11% (Gráfico 2).

Figura 14 – Imunofenotipagem das células progenitoras da MOA de cães jovens GRMD. Foi avaliada por citometria de fluxo pela técnica de imunofenotipagem e encontra-se expressa na forma de histograma: STRO-1+, CD105+, Oct3/4+, CD44+, CD34+

Gráfico 2 – Porcentagem da expressão das células frente cada anticorpo, STRO-1, CD105, Oct3/4, CD45 e CD34

5.1.3.3 Caracterização (Potencial de diferenciação)

Obtivemos resultado positivo tanto na diferenciação condrogênica, como na osteogênica. A diferenciação condrogênica confirmada através da coloração de Tricomo de Masson (Figura 11 A). A diferenciação osteogênica mostrou-se através da coloração de VON-KOSSA (Figura 11 B).

Figura 11 – A: Fotomicrografia da diferenciação condrogênica das células oriundas da MOA de cães jovens GRMD coradas pela técnica de Tricomo de Massom, visualizamos tecido cartilagineo corado em azul. Aumento de 20x. B: Fotomicrografia da diferenciação osteogênica das células oriundas da MOA de cães jovens GRMD em células diferenciadas em osteócitos (setas) coradas pelo método de *Von Kossa*. Aumento de 40x

5.2 SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO GÊNICO MUTANTE RESPONSÁVEL PELA DISTROFIA MUSCULAR.

Através de uma amostra da cultura de células mesenquimais MOA de cães GRMD, foi realizado PCR para amplificar o gene de interesse utilizando dois primers que foram projetados com base na seqüência depositada (310 pb a partir da posição 27881712-27881279 Genbank NC_006621.2). Logo após foi realizado seqüenciamento

pela empresa Instituto Ludwig (Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) para seqüenciamento utilizando-se os mesmos primers descritos acima onde utilizamos um software (BioEdit Sequence Alignment Editor) para termos um consenso que segue abaixo. Esse consenso foi comparado no banco de dados (NCBI) onde podemos identificar a mutação correspondente da distrofia muscular por apenas uma troca de par de base, este, marcado em negrito:

```
CTTAAGGAATGATGGGCATGGGTTGTCAATTA AAAATCAGAAATGAAGTGAATCTTG
TGAAATATTGTAAATTGATTTATATTTATTTTATATGTGTGTGTTTCGGGCCAGACC
TGTTTGATTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGCCTGGAACAT
GCATTCAACATTGCCAAATATCAATTAGGCATAGAGAACTGCTTGATCCTGAAGGT
CGGTACATTTCTGGACTACCATAGTTTTTAGTATAGTTTAATATTTATAATCTCAGAC
TTAACATTTCTACAACTAAGCAT
```

5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA DISTROFIA MUSCULAR EM GOLDEN RETRIEVERS POR *RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM* (RFLP)

O referido teste foi realizado através da confirmação da RFLP, fazendo-se distinção entre os genótipos, sendo eles, portadores, normais e afetados. Visto que para o diagnóstico a utilização da RFLP produz três bandas para portadoras, duas bandas para alelos afetados e uma banda para o alelo normal (Figura 12).

Figura 12 - Diagnóstico de cães da raça Golden Retriever para Distrofia Muscular (GRMD) foi feito através da PCR digerido com Sau96I que produz bandas as de 240 e 70 pb do alelo mutantes

5.4 CONSTRUÇÃO DO VETOR DOADOR

Conseguimos inserir somente o BD no vetor doador. Para dar continuidade a essa etapa, faltou a inserção do BE no vetor doador. Por esse motivo, ele não foi transfectado após a atenuação da proteína Ku70 via RNAi.

5.5 PRODUÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA INTERFERÊNCIA

A produção dos fragmentos de RNAi para o gene ku70 (Figura 13) foi validada utilizando-se fragmentos de RNA dupla fita correspondente ao gene ku70 canina, a partir de fragmentos de PCR, promotor T7 e enzima *Dicer* para produzir os siRNA (19 a 21 nucleotídeos). A produção dos fragmentos foi baseada no processo de transcrição o qual facilitou a produção *in vitro* da dupla fita de RNA (dsRNA), direcionado à um determinado gene de interesse.

Figura 13 - Síntese de siRNA para o gene ku70 em cães da raça Golden Retriever. (A) Amplificação do gene em gel de agarose 1%, resultando em 167 pb para Éxon 5. (B) Geração da fita dupla de RNA, a partir da fita simples “sense” e “antisense”. (C) dsRNA em siRNA pela enzima *Dicer*

5.6 TRANSFEÇÃO DO VETOR pEGFP POR LIPOFECTAMINA E POR ELETROPORAÇÃO NAS CTMs DE MOA DE CÃES JOVENS DISTRÓFICOS

Nesta etapa, buscamos avaliar a eficiência de transfecção de MOA isoladas dos cães jovens distróficos utilizando um vetor de DNA, circular, que expressa o gene marcador pEGFP-N1 (*green fluorescen protein*), visando a otimização do protocolo de transfecção dos cultivos celulares que serão utilizados para terapia gênica. Após experimentos preliminares, verificou-se que utilizando a eletroporação/nucleofecção, obtinham-se melhores resultados de transfecção quando comparados à lipofecção (Figura 14).

O experimento da transfecção do vetor que codifica a proteína verde fluorescente (pEGFP) permitiu uma visualização em microscopia óptica que tenha epifluorescência.

Figura 14- CTMs da MOA de cães jovens GRMD transfectadas com pEGFP-N1 circular para avaliar o nível de transfecção citoplasmática. Células transfectadas com lipofetamina em A células em cultivo sob microscopia de luz; em B sob microscopia de epifluorescência. Células transfectadas com nucleofector em C células em cultivo sob microscopia de luz, em D sob microscopia de epifluorescência. Aumento 20x

5.7 EFICIÊNCIA DO RNAi POR PCR EM TEMPO REAL

A figura 15 demonstra o efeito da utilização do RNAi sobre a degradação do RNAm para a KU70 (EXON 5). Sendo observada a maior inibição após 48h utilizando 10 PMOL ou 72h com 20 PMOL de RNAi KU70-EXON5 e o menor efeito inibitório após 96h com 10 PMOL.

Figura 15 - Expressão relativa do RNAm da KU70-EXON 5 em amostras de CT da MOA de cães jovens GRMD não tratadas ou tratadas por 24h, 48h, 72h ou 96h com 10PMOL ou 48h e 72h com 20PMOL de RNAi KU70-EXON5

6 DISCUSSÃO

Uma das dificuldades encontradas logo no início deste trabalho foi a eleição da melhor fonte de CT para a tentativa da correção da mutação genética no modelo canino para distrofia muscular (GRMD).

Todas as células estudadas, independente do tecido que foram coletadas, foram oriundas de cães distróficos. A primeira linhagem de CT que testamos, foi a célula oriunda do cordão umbilical. Segundo Barker et al. (2003), linhagens de células progenitoras de cordão umbilical se mostraram satisfatórios, não corroborando com nossos resultados, onde o cultivo não gerou quantidade apropriada de células para cultivo, inviabilizando seu uso neste projeto. Como Yu-Jen et al. (2006) já haviam afirmado, citando que um milhão de células mononucleares plaqueadas a partir do sangue de cordão umbilical humano apresentam um décimo da frequência de unidade formadora de colônia tipo fibroblasto encontrada na medula óssea plaqueada com a mesma concentração.

A segunda linhagem de células progenitoras estudadas, foram as células oriundas do saco vitelino. Essas células além de apresentar características hematopoiéticas (GARCIA-PORRERO; GODIN; DIETERLEN-LIÈVRE, 1995), apresentaram morfologia de células mesenquimais (fusiformes com núcleo reduzido), comprovada pela imunocitofluorescência através do anticorpo Oct4 e vimentina o que foi visto também pelos autores Wang et al. (2008). Apesar dessas células apresentarem características de células tronco, elas não foram viáveis, por não manter boa confluência, durante as passagens, por esta razão, descartamos esse tipo celular.

Uma terceira linhagem pesquisada foram às células do âmnio, uma vez que os autores In't Anker et al. (2003) e Kunisaki et al. (2007), afirmam que as células mesenquimais do âmnio apresentam maior capacidade de expansão que CTMs derivadas de outras fontes, como da medula óssea neonatal, de um adulto e do cordão umbilical. Essa linhagem apresentou diversas características desejáveis para cultivo, esses dados concordam com diversos trabalhos sobre essa mesma linhagem, porém, em modelo humano (SIEGEL et al., 2007; DE COPPI et al., 2007; KUNISAKI et al., 2007), quando essas células foram usadas em testes pré-clínicos, evidenciou a

presença de tumores, devido sua capacidade de geração tumoral, o que a fez descartada de nossos estudos.

As células mesenquimais obtidas do sangue de cordão umbilical apresentaram vantagens sobre as células obtidas da medula óssea, por serem coletadas durante o nascimento, sem necessidade de sedação ou anestesia para o seu procedimento, nem analgesia após a coleta. Não havendo danos ao recém nascido durante a obtenção do sangue (PARK et al., 2006; LU et al., 2006). Essa vantagem também é característica das células oriundas das membranas fetais. A desvantagem dessas células (cordão umbilical, membranas fetais) em relação às da medula óssea, são exatamente o momento em que podem ser extraídas, ou seja, no momento imediato pós-parto. Uma vez que, em muitos casos de doenças genéticas, como a distrofia muscular, o diagnóstico é tardio ao nascimento, impossibilitando o uso dessas células acima citadas e já estudadas. Dessa forma, visando o tratamento de todos aqueles afetados por estas patologias genéticas, julgamos que as células da medula óssea adulta, é uma excelente fonte de estudo e uma nova ferramenta para futuras terapias celulares e gênicas.

Por último então, testamos as células oriundas da medula óssea dos cães distróficos adultos (3 anos) e posteriormente, dos cães distróficos jovens (4 – 8 meses). As células dos cães adultos se mostraram com característica morfológica semelhante às células tronco mesenquimais, porém, na realização da curva de crescimento, elas não passaram da terceira passagem, esses dados se encontram com os dados de Wenceslau et al. (2011), que trabalhou com medula óssea canina fetal, o que as tornaram inviáveis para a terapia gênica. Já as células da medula óssea de cães jovens, apresentaram as mesmas características morfológicas dos cães adultos, com a vantagem, de obter uma boa curva de crescimento, viabilizando-as para a terapia gênica. Dados esses importantes, pois foram mais satisfatórios, quando comparados as curvas de crescimento tanto das nossas células da medula óssea de fetos (WENCESLAU et al., 2011) e de cães adultos.

Acreditamos que essa dificuldade na melhor escolha da célula, seja devido ao fato de que as CTMs de indivíduos não saudáveis, terem uma menor capacidade proliferativa, quando comparadas às células de indivíduos saudáveis, corroborando com achados de Herrero e Pérez-Simón (2010).

Uma vez que essas células apresentaram boa passagem, estudamos seu potencial de diferenciação e pela citometria de fluxo, para comprovarmos a origem dessas células. Na cultura celular primária, vimos que essas células tem inicialmente população heterogênea e aderente a placa de cultivo, concordando com o Caplan (1991) após 4 dias de cultivo, essas colônias se tornam homogêneas, e após 15 dias em cultivo, elas apresentam características semelhantes a fibroblastos. Através da citometria de fluxo vimos a expressão do anticorpo CD105 e STRO-1 tendo a comprovação de que são CTMs. Realizamos também a diferenciação osteogênica, com a visualização de mineralização de matriz celular e a diferenciação condrogênica, visualizando a formação de tecido cartilagíneo, igualmente realizado por Rhodes e Klug (1993) em ovinos. Uma outra vantagem e motivo de eleição do uso dessas células, é o momento de obtenção das mesmas. Mesmo que para a coleta seja necessário que o animal esteja sedado, ela pode ser realizada em qualquer momento da vida do paciente, e isso tem importância, pois os pacientes humanos apresentam sinais clínicos da doença somente entre 3 a 5 anos de vida (MOURA, 2009), o que inviabilizaria o uso das fontes celulares anteriormente citadas.

A citometria de fluxo foi importante para observarmos que continham mais um tipo de linhagem celular na cultura, pois foi positiva para todos os nossos marcadores. O STRO-1, marcador de célula mesenquimal, foi positivo, o que era esperado, e também demonstrado por Gronthos et al. (1994); Stewart et al. (1999); Walsh et al. (2000); Shen et al. (2011) e Kim et al. (2011), que trabalharam com células de medula óssea humana. Kim et al. (2011) citam ainda que a fluorescência da citometria de fluxo diminui conforme as passagens das células e ainda que 0,73 – 2,3% são consideradas fortes marcações, a sua marcação foi de 0,81%, mas não citou a passagem, a marcação das nossas células foi de aproximadamente 50,45%, na passagem 5, considerando uma marcação de células fortemente positivas.

O marcador de CTMs CD105, que também marcou positivamente em nossas células, foi também estudado por Jeon et al. (2011) e Lubis et al. (2011), com células de medula óssea humana, marcadas positivamente com o CD105. Lubis et al. (2011), estudou diferentes pacientes humanos, e como média de marcação positiva foi de

95,05 – 99,30% para o CD105 e nossa marcação foi de 54,75%, que mesmo tendo uma menor porcentagem, não deixa de ser considerada positiva.

O marcador de células tronco hematopoiéticas CD45 e CD34, que esse último ainda marca célula tronco progenitora endotelial, e ambas não marcam célula tronco mesenquimais (XU et al., 2004; DOMINICI et al., 2006; MOUSAVI et al., 2009; JEON et al., 2011; LUBIS et al., 2011), em nossos resultados, esses marcadores foram positivos, o mesmo ocorreu com os autores Simmons e Torok-Storb (1991); Chen et al. (2011) e Zhang et al. (2011) que também obtiveram através de cultura de células da medula óssea, marcação positiva, tornando assim uma cultura com diferentes linhagens celulares. Zhang et al. (2011) ainda diz que por mais que houvesse uma baixa marcação de CD34 (0,79%) e CD45 (0,84%), elas são suficientes para serem consideradas células hematopoiéticas e precursoras endoteliais, nossas células tiveram uma porcentagem maior de células marcadas, CD34 54,20% e CD45 46,45%.

Oct3/4 é um marcador de células pluripotentes, células essas com características mais primitivas que as células multipotentes, uma vez que obtivemos marcações positivas para as células multipotentes, foi uma surpresa a marcação positiva também para as células Oct3/4. Asumda, Chase (2011), cultivaram células de medula óssea de ratos adultos (4 meses), e através da citometria de fluxo, foram positivas para Oct3/4, além do CD105, já em ratos com 15 meses, foram negativas para Oct3/4, e positiva para CD105, isso os fizeram acreditar que essas células positivas para Oct3/4, seriam uma população sobrevivente de fases mais primitivas do desenvolvimento. Sung et al. (2010) estudou as células da medula óssea de abortamentos humanos no terceiro trimestre da gestação, observando marcação positiva para o Oct3/4. Esses resultados nos fazem acreditar que nossa linhagem de células, tem boa capacidade de pluripotência, pois marcaram positivamente para Oct3/4 com a porcentagem de 75,11%, em animais com idade entre 4 – 8 meses.

Uma vez estabelecido o protocolo de cultivo celular (células da medula óssea de cães distróficos jovens), foi feito o seqüenciamento do fragmento gênico mutante responsável pela distrofia muscular. O seqüenciamento do nosso modelo canino distrófico, quando comparado ao seqüenciamento do banco de dados NCBI, foi confirmado o ponto da mutação estabelecida por Bartlett et al. (1996).

Quando analisada a transfecção do pEGFP, com lipofetamina e nucleofector, nas células de MOA de cães jovens GRMD nossos resultados mostram que a transfecção com lipofetamina foi menor do que com nucleofecção, isso pode ser ao fato de que os lipídeos (usados na técnica de lipofetamina), são freqüentemente tóxicos para as células, segundo Boczkowski e Nair (2010). Já a transfecção por nucleofecção, a qual obtivemos melhores resultados, consideramos uma boa técnica, pois não necessita de reagentes adicionais, como na lipofecção, é compatível com uso clínico e se tornou método de escolha para muitos pesquisadores (WANG et al., 2009; BOCZKOWSKI E NAIR, 2010).

No modelo canino GRMD, nunca havia sido testado o RNAi com a intenção de atenuar a proteína Ku70, o que torna nossos resultados inovadores. Como referência, nos embasamos em trabalhos com células humanas pesquisadas por Bertolini et al. (2007, 2009) onde utilizaram o RNAi com sucesso para atenuação da Ku70 em células humanas cancerígenas HCT116, proteína essa, utilizada em nosso trabalho.

A proteína Ku70 foi silenciada através da inibição de sua transcrição, confirmada através de RT-PCR, o que corrobora com Vaucheret, Béclin e Fagard (2001) e Tang e Galili (2004), definindo que o silenciamento gênico consiste na repressão da expressão de um gene alvo pela inibição da transcrição.

A proteína Ku 70, foi a proteína de escolha pois ela tem um importante papel na recombinação não-homóloga. Obtivemos sucesso na atenuação da Ku 70, o que nos sugere que houve uma diminuição da recombinação não-homóloga. Em experimentos futuros, será feita a transfecção de um vetor doador, que irá integrar no DNA endógeno, com a finalidade de aumentar a eficiência da recombinação homóloga. Para que futuramente possa acontecer a correção gênica, será necessário um aumento significativo do *gene targeting*.

Considerando os resultados obtidos, este trabalho poderá colaborar na elaboração de possíveis tratamentos utilizando a terapia gênica. Além disso, abre algumas perspectivas sobre medidas terapêuticas para algumas doenças genéticas.

7 CONCLUSÕES

- As células obtidas da MOA de cães distróficos jovens (4-8 meses) foram as melhores células de todas estudadas no presente trabalho.
- As células da MOA de cães distróficos jovens (4-8meses) é uma boa fonte de células, pois são fáceis de manter em cultivo e apresentam plasticidade.
- Analisada por microscopia de luz encontrou-se a nucleofecção como a forma mais eficiente para transfecção do vetor pEGFP em células tronco mesenquimais de MOA de cães jovens distróficos (4-8meses), quando comparada, com a lipofecção.
- Conseguimos construir e transfectar o RNAi na espécie canina, e atenuar a proteína de interesse Ku70 onde o melhor tempo de atenuação foi de 48 horas a 10 PMOL ou 72h com 20 PMOL.

REFERÊNCIAS

- AHNESORG, P.; SMITH, P.; JACKSON, S. P. XLF interacts with the Xrcc4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. **Cell**, v. 124, p. 301–313, 2006.
- AIGNER, A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, p. 9–21, 2007.
- ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. M.; MIGLINO, M. A.; MORAIS-PINTO, L. Morphology of the “funiculus umbilicalis” in woolless mongrel sheep (*Ovis Áries*, L. 1758) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 348-354, 2000.
- ANGAJI, S. A.; HEDAYATI, S. S.; POOR, R. H.; MADANI, S.; POOR, S. S.; PANAHI, S. Application of RNA interference in treating human diseases. **Journal Genetic**, v. 89, p. 527–537, 2010.
- ARAUJO, A. P. Q.; DECO, M. C.; KLÔH, B. S.; COSTA, M. R.; GÓIS, F.V.; GUIMARÃES, A. F. C. M. Diagnosis delay of duchenne muscular dystrophy. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 2, p. 179-183, 2004.
- ARAVIN, A.; TUSCHL, T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5830-5840, 2005.
- ASUMDA, F. Z.; CHASE, P. B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. **BMC Cell Biology**, v. 12, n. 44, p. 1-11, 2011.
- BARKER, J. N.; WAGNER, J. E. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 48, n. 1, p. 35-43, 2003.
- BARTLETT, R. J.; WINAND, N. J.; SECORE, S. L.; SINGER, J. T.; FLETCHER, S.; WILTON, S.; BOGAN, D. J.; METCALF-BOGAN, J. R.; BARTLETT, W. T.; HOWELL, J. M.; COOPER, B. J.; KORNEGAY, J. N. Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p. 650-654, 1996.
- BELTRAMI, A. P.; CESSSELLI, D.; BERGAMIN, N. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). **Blood**, v. 110, p. 3438–3446, 2007.
- BERNE, R. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 236-237.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, p. 363-

366, 2001.

BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B.; MAGA, E. A.; MADDEN, K. R.; MURRAY, J. D. Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 246-257, 2007.

BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; MAGA, E. A.; MADDEN, K. R.; MURRAY, J. Increased Gene Targeting in Ku70 and Xrcc4 Transiently Deficient Human Somatic Cells. **Molecular Biotechnology**, v. 41, p. 106–114, 2009.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, Ohio, v.19, n.3, p.180-192, 2001.

BIBIKOVA, M. D.; CARROLL, D.; SEGAL, D. J.; TRAUTMAN, K.; SMITH, J.; KIM, Y. G.; CHANNDRASEGARAN, S. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 1, p. 289-287, 2001.

BOCZKOWSKI, D.; NAIR, S. RNA as performance-enhancers for dendritic cells. **Expert Opin Biology. Therapy.**, v. 10, n. 4, p. 563-574, 2010

BRADLEY, A.; RAMIRES-SOLIS, R.; ZHEHG, H.; HASTY, P.; DAVIS, A. Genetic manipulation of the mouse genome via gene targeting in embryonic stem cells. **Ciba Foundation Symposium**, v. 165, p. 256-269, 1992.

BUCK, D.; MALIVERT, L.; DE CHASSEVAL, R.; BARRAUD, A.; FONDANÈCHE, M. C.; SANAL, O.; PLEBANI, A.; STÉPHAN, J. L.; HUFNAGEL, M. LE DEIST, F.; FISCHER, A.; DURANDY, A.; DE VILLARTAY, J.P.; REVY, P. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. **Cell**, v. 124, p. 287–299, 2006.

CAMIRAND, G.; CARON, N. J.; ASSELIN, I.; TREMBLAY. Combined immunosuppression of mycophenolate mofetil and FK506 for myoblast transplantation in *mdx* mice. **Transplantation**, v. 72, p. 38-44, 2001.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. **Blood**, v. 98, p. 2396–2402, 2001.

CAPECCHI, M. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 507-512, 2005.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641–650, 1991.

- CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Molecular Medicine**, v. 7, p. 259–264, 2001.
- CARROLL, D. Using nucleases to stimulate homologous recombination. **Methods in Molecular Biology**, v. 262, p. 195-207, 2004.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, J. E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642–655, 2009.
- CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426-433, 2009.
- CHEN, R.; YU, H.; JIA, Z. Y.; YAO, Q. L.; TENG, G. J. Efficient nano iron particle-labeling and noninvasive MR imaging of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 511-519, 2011.
- CHOI, K. The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 11, n. 1, p. 91-101, 2002.
- CÔCO, M.; WON HAN, S.; SALLUM, J. M. F. Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n. 4, p. 560-566, 2009.
- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.
- COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKEL, L. M.; SCOTT, M. O.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. J. The homologue of the duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.
- DECONINCK, A. E.; RAFAEL, J. A.; SKINNER, J. A.; BROWN, S. C.; POTTER, A. C.; METZINGER, L.; WATT, D. J.; DICKSON, J. G.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, p. 717-727, 1997.
- DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. F.; PINHEIRO, L. C. P. Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto na ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, v. 51, n. 295, p. 411-418, 2004.
- DE COPPI, P.; BARTSCH, G. JR.; SIDDIQUI, M. M.; XU, T.; SANTOS, C. C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A. C.; SNYDER, E. Y.; YOO, J. J.; FURTH, M. E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **In Nature Biotechnology**, v. 25, n. 01, p.100-104, 2007.
- DING, S. W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. **Cell**, v. 130, p. 413-426, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EGHTESAD, S.; MOREL, P. A.; CLEMENS, P. R. The companions: regulatory T cells and gene therapy. **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 1–7, 2009.

EMERRY, A. E. H. **Duchenne Muscular Dystrophy**. Oxford: Oxford University Press, 1993.

ENDERS, A. C.; KING, B. F. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. **American Journal of Anatomy**, v. 181, p. 327-340, 1988.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 167-194, 2000.

FARINI, A.; RAZINI, P.; ERRATICO, S.; TORRENTE, Y.; MEREGALLI, M. Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, p. 526–534, 2009.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

FUCHS, E.; SEGRE, J. Stem Cell: A new lease on life. **Cell**, v. 100, p. 143-155, 2000.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GARCIA-PORRERO, J. A.; GODIN, I. E.; DIETERLEN-LIÉVRE, F. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. **Anatomy and Embryology**, v. 192, p. 425–435, 1995.

GASCHEN, F. P.; SWENDROWSKI, M. A.; HAUGH, P. G.; Hypertrophic feline muscular dystrophy- a unique clinical expression of dystrophin deficiency. **Feline Practice**, v. 22, p. 23-26, 1994.

GINN, S. L. J. A.; CURTIN, B.; KRAMER, C. M.; SMYTH, M.; WONG, A.; KAKAKIOS, G. B.; MC COWAGE, D.; WATSON, S. I.; ALEXANDER, M.; LATHAM, S. C.; CUNNINGHAM, M.; ZHENG, L.; HOBSON, P. B.; ROWE, A.; FISCHER, M.; CAVAZZANA-CALVO, S.; HACEIN, B. A.; ALEXANDER, I. E. Treatment of an infant

with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. **The Medical journal of Australia**, v. 182, p. 458-463, 2005.

GLOBERSON, A.; WOODS, V.; ABEL, L.; MORRISSEY, L.; CAIRNS, J. S.; KUKULANSKY, T.; KUBAI, L.; AUERBACH, R. In vitro differentiation of mouse embryonic yolk sac cells. **Differentiation**, v. 36, p.185-193, 1987.

GREGORY, B. D.; O'MALLEY, R. C.; LISTER, R.; URICH, M. A.; TONTI-FILIPPINI, J.; CHEN, H.; MILLAR, A. H.; ECKER, J. R. A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* Development. **Developmental Cell**, v. 6, p. 854-866, 2008.

GRISHOK, A. RNAi mechanisms in *C. elegans*. **FEBS Letters**, v. 579, v. 26, p. 5932-5939, 2005.

GROENENBOOM, M. A. C.; MARÉE, A. F. M.; HOGEWEG, P. The RNA Silencing Pathway: The bits and pieces that matter. **PLoS Computational Biology**, v. 1, p. 155-165, 2005.

GRONTHOS, S.; GRAVES, S. E.; OHTA, S.; SIMMONS, P. J. The STRO-1+ Fraction of Adult Human Bone Marrow Contains the Osteogenic Precursors. **Blood**, v. 84, n. 12, p. 4164-4173, 1994.

HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, p. 293-296, 2000.

HERRERO, C.; PÉREZ-SIMÓN, J.A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43 n. 5, p. 425-430, 2010.

HOLLANDS, P. Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early post-implantation mouse embryos. **Development**, v. 99, p. 69-76, 1987.

HOWELL, J. M.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, n. 5, p. 325-328, 1997.

HU, Y.; LIAO, L.; WANG, Q.; MA, L.; MA, G.; JIANG, X.; ZHAO, R.C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, n. 5, p. 342-349, 2003.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 22–32, 2008.

IN'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN, K. C.; NOORTWA, C.; WILLEMZE, F. W. E.; KANAHSI, H. H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v. 102, p. 1548-1549, 2003.

- IN'T ANKER, P.S. SCHERJON, S. A.; KEUR, C. K.; GROOT-SWINGS, G. M. J. S.; CLAAS, F. H. J.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells**, v. 22, p. 1338-1345, 2004.
- JEON, M. S.; YI, T. G.; LIM, H. J.; MOON, S. H.; LEE, M. H.; KANG, J. S.; KIM, C. S.; LEE, D. H.; SONG, S. U. Characterization of mouse clonal mesenchymal stem cell lines established by subfractionation culturing method. **World Journal of Stem Cells**, v. 3, n. p. 70-82, 2011.
- JINEK, M.; DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, p. 405-412, 2009.
- JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant biology**, v. 57, p. 19–53, 2006.
- JORDE, L. B. **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 111-113.
- KAVI, H. H.; FERNANDEZ, H.; XIE, W.; BIRCHLER, J. A. RNA silencing in *Drosophila*. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5940-5949, 2005.
- KAWAKAMI, S.; HASHIDA, M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 22, p. 142–151, 2007.
- KIM, S. H.; KIM, Y. S.; LEE, S. Y.; KIM, K. H.; LEE, Y. M.; KIM, W. K.; LEE, Y. K. Gene expression profile in mesenchymal stem cells derived from dental tissues and bone marrow. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 41, n. 4, p. 192-200, 2011.
- KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. The stem cells. **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions**. United States. National Institutes of Health. 2001, p. 1-3.
- KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, A.; HASEGAWA, D.; FUJITA, M.; ORIMA, H.; TAKEDA, S. Evaluation of dystrophic dog pathology by fat-suppressed T2-weighted imaging. **Muscle Nerve**, v. 40, n. 5, p. 815-826, 2009.
- KUCIA, M.; RECA, R.; JALA, V. R.; DAWN, B.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M. Z. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 19, p. 1118–1127, 2005.
- KUCIA, M.; RECA, R.; CAMPBELL, F. R. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(p)SSEA-1(p)Oct-4p stem cells identified in adult bone marrow. **Leukemia**, v. 20, p. 857–869, 2006.

KUNISAKI, S. M.; FUCHS, J. R.; STEIGMAN, S. A.; FAUZA, D. O. A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. **Tissue Eng**, v. 13, n. 11, p. 2633-2644, 2007.

LANZOV, V. A. Gene targeting for gene therapy: prospects. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 68 276-282, 1999.

LEE, T. W.; MATTHEWS, D. A.; BLAIR, G. E. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy, **Biochemical Journal**, v. 387, p. 1-15, 2005.

LENNON, D. P.; HAYNESWORTH, S. E.; BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; CAPLAN, A.I. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identi@cation of serum for optimal selection and proliferation. **In Vitro Cell Dev Biol-Animal**, v. 32, p. 602-611, 1996.

LEVIN, L. A.; RITCH, R.; RICHARDS, J.; BORRÁS, T. Stem cell therapy for ocular disorders. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, p. 621-627, 2004.

LI, H. W.; DING, S. W. Antiviral silencing in animals. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5965-5973, 2005.

LIEBER, M. R.; MA, Y.; PANNICKE, U.; SCHWARZ, K. Mechanism and regulation of human nonhomologous DNA endjoining. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 712–720, 2003.

LIU, C. P.; AUERBACH, R. In vitro development of murine T cells from prethymic and preliver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. **Development**, v. 113, p. 1315-23, 1991.

LU, L. L.; LIU, Y. J.; YANG, S. G.; ZHAO, Q. J.; WANG, X.; GONG, W.; HAN, Z. B.; XU, Z. S.; LU, Y. X.; LIU, D.; CHEN, Z. Z.; HAN, Z. C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica**, v. 91, n. 8, p. 1017-1026, 2006.

LUBIS A. M.; SANDHOW, L.; LUBIS, V. K.; NOOR, A.; GUMAY, F.; MERLINA, M.; YANG, W.; KUSNADI, Y.; LORENSIA, V.; SANDRA, F.; SUSANTO, N. H. Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from iliac crest bone marrow for further cartilage defect management. **Acta Medica Indonesiana**, v. 43, n. 3, p. 178-84, 2011.

MAO, C. P.; LIN, Y. Y.; HUNG, C. F.; WU, T. C. Immunological research using RNA interference technology. **Immunology**, v. 121, 295-307, 2007.

MATZKE, M. A.; BIRCHLER, J. ARNAi-mediated pathways in the nucleus. **Nature reviews Genetics**, v. 6, p. 24-35, 2005.

MCCORMACK, W. T.; TJOELKER, L. W.; THOMPSON, C. B. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 219-241, 1991.

MEIER, H. Myopathies in the dog. **Cornell Veterinary**. V. 48, p. 313–330, 1958.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; SANTOS MARTINS, D. dos'; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Stem cells characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem cells**. v. 23, p. 1549-1559, 2005.

MITCHELL, P. European researchers condemn US firm's cord-blood-storage patent. **Lancet**, v. 349, n. 9060, p. 1232, 1997.

MORALES, M. M. Terapias avançadas: célula tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. In: SANG, W. H. Introdução. **História da Terapia Gênica, Estado da Arte, Técnicas e Ética**. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 105-25.

MORGAN, J. E.; COULTON, G. R.; PARTRIDGE, T. A. Mdx muscle grafts retain the mdx phenotype in normal hosts. **Muscle Nerve**, v. 12, p. 401-409, 1989.

MOURA, M. C. D. S. **Alterações atencionais na distrofia muscular de Duchenne**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MOUSAVI NN, JABERIPOUR M, RAZMKHAH M, GHADERI A, HABIBAGAH M. Mesenchymal stem cells do not suppress lymphoblastic leukemic cell line proliferation. **Iranian Journal of Immunology**, v. 6, n. 4, p. 186-194, 2009.

MULLER, A. M.; MEDVINSKY, A.; STROUBOULIS, J.; GROSVELD, F.; DZIERZAK, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo., **Immunity**, v. 1, n. 4, p. 291-301, 1994.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 434-441, 2009.

NAKAYASHIKI, H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. **FEBS Letters**, v. 579, p. 950-957, 2005.

NORTH, T. L.; STACY, T. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. **Development**, v. 126, p. 2563–2575. 1999.

NOWOTNY, M.; YANG, W. Structural and functional modules in RNA interference. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, p. 286-293, 2009.

NUNES, V. A.; CAVACANA, N.; CANOVAS, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 4, p. 185-96, 2007.

OH, I. H.; FABRY, M. E.; HUMPHRIES, R. K.; PAWLIUK, R. LEBOULCH, P.; HOFFMAN, R.; NAGEL, R. L.; EAVES, C. Expression of an anti-sickling beta-globin in human erythroblasts derived from retrovirally transduced primitive normal and sickle cell disease hematopoietic cells. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 461-469, 2004.

ORR-WEAVER, T. L.; SZOSTAK, J. W.; ROTHSTEIN, R. J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1981, v. 78, p. 6354-6358.

PADMANABHAN, C.; ZHANG, X.; JIN, H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 465-472, 2009.

PARK, K. S.; LEE, Y. S.; KANG, K. S. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. **J Vet Sci**. v. 7, n. 4, p. 343-348, 2006.

PARKER, M. H.; KUHR, C.; TAPSCOTT, S. J.; STORB, R. Hematopoietic cell transplantation provides an immune-tolerant platform for myoblast transplantation in dystrophic dogs. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1340–1346, 2008.

PASSOS-BUENO, M. R.; VAINZOF, M.; MARIE, S. K.; ZATZ, M. Half the dystrophin gene apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 6, p. 919-922, 1994.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. A mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PERRY JS. The mammalian fetal membranes. *J Reprod Fertil*, v. 62, n. 2, p. 321-335, 1981.

PERSONS, D. A.; TISDALE, J. F. Gene therapy for the hemoglobin disorders. **Seminars in Hematology**, v. 41, p. 279-286, 2004.

PETERS, L.; MEISTER, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Molecular Cell**, v. 26, p. 611-623, 2007.

PORTEUS, M. H.; BALTIMORE, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. **Science**, v. 300, p. 763, 2003.

PRUETT-MILLER, S. M.; CONELLY, J. P.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; PORTEUS, M. H. Comparison of Zinc Finger Nucleases for Use in Gene Targeting in Mammalian Cells. **Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 16, n. 4, p. 707–717, 2008.

RAGOT, H.; VINCENT, N.; CHAFEY, P.; VIGNE, E.; GILGENKRANTZ, H.; COUTON, D.; CARTAUD, J.; BRIAND, P.; KAPLAN, J. C.; PERRICAUDET, M.; KAHN, A. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. **Nature**, v. 361, n. 6413, p. 647-650, 1993.

RATAJCZAK, M. Z.; MACHALINSKI, B.; WOJAKOWSKI, W.; RATAJCZAK, J.; KUCIA, M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4b stem cells in adult bone marrow and other tissues. **Leukemia**, v. 21, p. 860–867, 2007.

RHODES, D.; KLUG, A. Zinc fingers, **Scientific American**, v. 268, p. 56-59, 62-55, 1993.

ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, p.105–110, 2003.

ROMERO, N. B.; BRAUN, S.; BENVENISTE, O.; LETURCQ, F.; HOGREL, J. Y.; MORRIS, G. E.; BAROIS, A.; EYMARD, B.; PAYAN, C.; ORTEGA, V.; BOCH, A. L.; LEJEAN, L.; THIOUDELLET, C.; MOUROT, B.; ESCOT, C.; CHOQUEL, A.; RECAN, D.; KAPLAN, J. C.; DICKSON, G.; KLATZMANN, D.; MOLINIER-FRENCKEL, V.; GUILLET, J. G.; SQUIBAN, P.; HERSON, S.; FARDEAU, M. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy, **Human Gene Therapy**, v. 15, p. 1065-1076, 2004.

RÜSSE I, SINOWATZ F, RICHTER L, LEHMANN M, SCHALLENBERGER E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). *Anat Histol Embryol*, v. 21, n. 4, p. 324-347, 1992.

SALAMA, R.; WEISSMAN, S. L. The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v. 60 B, n. 1, p.111-115, 1978.

SARMIENTO, C.; NIGUL, L.; KAZANTSEVA, J.; BUSCHMANN, M.; TRUVE, E. AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. **Plant Molecular Biology**, v. 61, p.153-163, 2006.

SCHUMM, M; LANG, P; TAYLO, G; KUCI, S; KLINGEBIEL, T; BÜHRIN, H. J.; GEISELHARDT, D.; NIETHAMMER, D.; HANDGRETINGER, R. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34 cells using the CliniMACS device. **Journal of Hematotherapy**, v. 8, p. 209-218, 1999.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SETH, P. Vector-Mediated Cancer Gene Therapy: An Overview, **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 2005.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **J Vet Intern Med**, v. 15, n. 3, p. 240-244, 2001.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Muscular dystrophies and other inherited myopathies. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 32, p. 103-24, 2002.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 127-138, 2004.

SHEN, Y.; WANG, W.; LI, X.; LIU, Z.; MARKEL, D. C.; REN, W. Impacts of age and gender on bone marrow profiles of BMP7, BMPRs and Stro- 1(+) cells in patients with total hip replacement. **International orthopaedics**, 2011.

SHREY, K.; SUCHIT, A.; NISHANT, M.; VIBHA, R. RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, p. 273-277, 2009.

SIEGEL, N.; ROSNER, M.; HANNEDER, M.; VALLI, A.; HENGSTSCHLÄGER, M. Stem Cells in Amniotic Fluid as New Tools to Study Human Genetic Diseases. **Stem Cell Rev.** v. 3, p. 256-264, 2007.

SILVA, J. D. M.; COSTA, K. S.; CRUZ, M. C. Distrofia Muscular De Duchenne: Um Enfoque Cinesioterapêutico. **Lato & Sensus**, Belém, v. 4, n. 1, p. 3-5, 2003.

SIMMONS PJ, TOROK-STORB B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. **Blood**, v. 78, n. 1, p. 55-62, 1991.

SIOMI, H.; SIOMI, M. C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642–655, 2009.

SMITH, N. A. Total silencing by a intron-spliced hairpin RNA. **Nature**, v. 407, p. 319-320, 2000.

SOUZA, L. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado á inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de**

coelhos. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

STEWART, K.; WALSH, S.; SCREEN, J.; JEFFERISS, C. M.; CHAINEY, J.; JORDAN, G. R.; BERESFORD, J. N. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 8, p. 1345-1356, 1999.

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **NeuroRX**, v. 3, n. 2, p. 225-234, 2006.

SUNG, H. J.; HONG, S. C.; YOO, J. H.; OH, J. H.; SHIN, H.J.; CHOI, I. Y.; AHN, K. H.; KIM, S. H.; PARK, Y.; KIM, B. S. Stemness evaluation of mesenchymal stem cells from placentas according to developmental stage: comparison to those from adult bone marrow. **J Korean Med Sci**, v. 25, n. 10, p.1418-1426, 2010.

TANG, G.; REINHART, B. J.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. **Genes & Development**, v. 17, p. 49-63, 2003.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application, **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 463-469, 2004.

TAVIAN, M.; COULOBEL, C.; LUTON, D.; SAN CLEMENTE, E.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; PEAULT, B. Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. **Blood**, v. 87, p. 67–72, 1996.

TAVIAN, M.; HALLAIS, M. F.; PEAULT, B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. **Development**, v. 126, p. 793–803, 1999.

TIEDEMAN, J. J.; CONNOLLY, J. F.; STRATES, B. S.; LIPPIELLO, L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix an experimental study in dogs. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 268, p. 294-302, 1991.

TSUMAGARI, S.; OTANI, I.; TANEMURA, K.; NAMBA, S.; OHTAKI, T, KAMATA, H.; KANAYAMA, K. Characterization of CD34 cells from canine umbilical cord blood, bone marrow leukocytes and peripheral blood by flow cytometric analysis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1207-1209, 2007.

VAGS, A. K.; ROSIC-KABLAR, S.; GRATLEY, C. J.; ZHENG, Y.; CHESNEY, A.; VILLAGÓMEZ; KRUTH, S. A.; HOUGH, M. R. Derivation and Characterization of Canine Embryonic Stem Cell Lines with In Vitro and In Vivo Differentiation Potential. **Stem Cells**, v. 27, p. 329–340, 2009.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 88, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorders**, v.1, p. 31-38. 1991.

VAN GENT D. C.; HOEIJMAKERS J. H.; KANAA R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 196-206, 2001.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3083-3091, 2001.

VENDRUSCOLO, E. C. G. Silenciamento gênico e transgênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. ,2003.

VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 711-738, 2005.

WALSH, S.; JEFFERISS, C.; STEWART, K.; JORDAN, G. R.; SCREEN, J.; BERESFORD, J. N. Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 185-195, 2000.

WANG, K.; ZHOU, Q.; GUO, A. L.; XU, C. R.; AN, S. J.; WU, Y. L. An autologous therapeutic dendritic cell vaccine transfected with total lung carcinoma RNA stimulates cytotoxic t lymphocyte responses against non-small cell lung cancer. **Immunology Investigate**, v. 38, n. 7, p. 665-680, 2009.

WANG, X. Y.; LAN, Y.; HE, W. Y.; ZHANG, L.; YAO, H. Y.; HOU, C. M.; TONG, Y.; LIU, Y. L.; YANG, G.; LIU, X. D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**. v. 15, n. 111, p. 2436-2443, 2008.

WANG, Z.; CHAMBERLAIN, J. S.; TAPSCOTT, S. J.; STORB, R. Gene Therapy in Large Animal Models of Muscular Dystrophy, **ILAR Journal**, v. 50, n. 2, p. 187–198, 2009.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 203-220, 2000.

WASSENEGGER, M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. **Cell**, v. 122, p. 13-16, 2005.

- WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal Progenitor Cells from Canine Fetal Tissues: Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow. **Tissue Engineering: Part A**, v. 17, n. 17-18, 2011.
- WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **British Journal of Haematology**, v. 121, n. 2, p. 368-374, 2003.
- WIRTH, T.; KUHNEL, F.; KUBICKA, S. Telomerase-dependent gene therapy, **Current Molecular Medicine**, v. 5, p. 243-251, 2005.
- XU, W.; ZHANG, X.; QIAN, H.; ZHU, W.; SUN, X.; HU, J.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 7, p. 623-631, 2004.
- YANES, R. J.; PORTER, A. C. Therapeutic. **Gene Therapy**, v. 5, p. 149-159, 1998.
- YODER, M. C.; HIATT, K.; DUTT, P.; MUKHERJEE, P.; BODINE, D. M.; ORLIC, D. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. **Immunity**, v. 7, p. 335-344, 1997.
- YOKOTA, T.; LU, Q.; PARTRIDGE, T.; KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, A.; TAKEDA, S.; HOFFMAN, E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 6, p. 667-676, 2009.
- YUASA, K.; MIYAGOE, Y.; YAMAMOTO, K.; NABESHIMA, Y.; DICKSON, G.; TAKEDA, S. Effective restoration of dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-mediated transfer of truncated dystrophin cDNAs. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 329-336, 1998.
- YU-JEN C.; SHIH, C.; TZU-BI, S. D.; CHING-PING, T.; RZU-BOU, H.; DON-CHING, L.; SHIW-MIN, H. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 24 p. 679-685, 2006.
- ZATZ, M.; FROTA-PESSOA, O. Suggestion for a possible mitigating treatment of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Medical Genetics**, v. 10, n. 3, p. 305-307, 1981
- ZATZ, M.; VAINZOF, M.; PASSOS-BUENO, M. R. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2000.
- ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.

ZHANG, J.; XIE, S. S.; HAN, X. X.; REN, J. T.; LV, F. R.; TANG, J. M.; ZHENG, F.; GUO, L. Y.; YANG, J. Y.; KONG, X.; ZHANG, L.; HUANG, Y. Z.; WAN, J. N. Effect of vascular endothelial growth factor on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and the signaling mechanism. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. v. 31, n. 10, p. 1697-1700, 2011.