INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo
associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo
murino de osteogênese imperfeita**

ALISSANDRA DE MOURA GOMES

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni

São Paulo
2021

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo
associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo murino
de osteogênese imperfeita**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ALISSANDRA DE MOURA GOMES

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientador:

Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni

#

#

São Paulo
2021

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

GOMES, A. d. M. ***Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo murino de osteogênese imperfeita***. 2021. 131 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Alissandra de Moura

Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo murino de osteogênese imperfeita / Alissandra de Moura Gomes; orientadora Cibele Nunes Peroni. -- São Paulo, 2021.

131 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2021.

1. Osteogênese Imperfeita. 2. Terapia gênica. 3. Terapia celular. 4. Camundongo oim. 5. Hormônio de crescimento. I. Peroni, Cibele Nunes, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Alissandra de Moura Gomes

Título: Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo murino de osteogênese imperfeita.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido e amigo Rodrigo, por ser o maior apoiador de todos os meus sonhos e por sempre acreditar que eu sou maior do que sempre acreditei;

À todas as mulheres que sonham em ser cientistas e à todas aquelas que conquistam seu espaço nesse campo incrível.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cibele, pela oportunidade que me deu, há quatro anos, de poder fazer parte do grupo de Terapia Gênica, por acreditar no meu trabalho, e por todo seu apoio acadêmico e principalmente pessoal;

Ao Dr. Paolo Bartolini, por todo apoio acadêmico, por acreditar no meu trabalho e potencial, e por toda experiência compartilhada;

À Dra. Érika Rangel e seu grupo, por disponibilizarem as células-tronco e todo conhecimento e suporte. Sem elas, este trabalho não teria ido para frente;

À Prof. Dra. Ana Cláudia da UNIFESP de Santos por abrir as portas do seu laboratório para que pudéssemos realizar algumas análises, e ao Matheus, pela grande ajuda na reta final deste trabalho;

Ao Fernando, do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) no ICB IV/USP, pelo suporte técnico durante as análises realizadas em seu laboratório;

Ao grupo do Professor Leonardo e Anderson Maikon da UNESP, Campus Araçatuba, pelas análises histológicas, vocês são sensacionais;

À tecnologista Elizabeth Somessari e sua equipe, no CETER, pela irradiação dos animais e por toda a ajuda referente a este procedimento;

Ao Dr. Daniel Perez, Dra. Regina Affonso, Dra. Maria Helena, Dra. Miriam e Dr. Johnny por sempre tirarem minhas dúvidas e me mostrarem ótimos caminhos;

Ao meu amigo Enio, por toda a parceria durante estes anos de CEBIO, por me ajudar nos experimentos, nas discussões, em questões pessoais, e por me aguentar em dias de estresse;

Ao Gustavo, por todo ensinamento, ajuda, experiência, amizade e carinho durante todos esses anos, além disso, por proporcionar dias de muita risada;

Aos amigos Vanessa, Rafael e Darle por todo apoio técnico nos laboratórios, principalmente durante a pandemia, sem vocês nada disto teria dado certo;

À Eliana, Eliza e Claudinha que antes de mim, desenvolveram um grande projeto na terapia gênica, e continuam dando todo suporte, ajuda nos experimentos, e compartilhando suas experiências;

Aos meus amigos: Thaís Sevilhano, Carol, Renan, Thaís Caramori, Amanda, Felipe, Matheus, Priscila, Ana, Mayele e Pamela pelo conhecimento compartilhado e, principalmente pelos momentos de descontração, risada, guloseimas, revoltas e amizade;

Aos amigos Junqueira e Rosangela pelo apoio técnico;

À Neide, Mara, Cecília, Ana Cláudia e Patrick, pelo apoio técnico no Biotério do IPEN;

Ao Dr. Carlos, por cuidar do CEBIO e sempre procurar o melhor para o centro;

À minha família, por sempre acreditar em mim e pelo apoio que sempre me deram, mesmo quando as condições não eram favoráveis;

A todos os outros amigos(as) da vida que sempre acreditaram em mim;

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, sob o processo 2017-15503-9;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado, sob o processo 134175/2018-2;

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), ao Centro de Biotecnologia (CEBIO) e ao Biotério do IPEN por proporcionar o espaço, suporte e os materiais necessários para que este projeto pudesse ser realizado;

A todos que contribuíram, mesmo indiretamente, para que tudo desse certo.

Muito obrigada!

“There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the something you were after.”

J.R.R. Tolkien

RESUMO

GOMES, A. M. **Eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento de camundongo associada à administração de células-tronco mesenquimais em modelo murino de osteogênese imperfeita**. 2021. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Ensaio pré-clínicos e clínicos de terapia gênica e terapia celular vêm sendo desenvolvidos e aplicados de forma bastante promissora, ao longo das últimas décadas, frente à procura pela cura ou pela melhora efetiva de diversas desordens genéticas. Nosso grupo de Terapia Gênica do Centro de Biotecnologia, do IPEN, possui ampla experiência na entrega *in vivo* de DNA plasmidial contendo os genes do hormônio de crescimento humano (hGH) e murino (mGH) para o tratamento de camundongos GH-deficientes, desenvolvendo protocolos que apresentaram resultados bastante relevantes nos últimos 10 anos. Diante disso, neste trabalho propomos uma abordagem inédita baseada na associação entre a terapia gênica *in vivo* e o transplante alogênico de células-tronco mesenquimais para o tratamento da osteogênese imperfeita (OI) em um modelo murino, o camundongo *oim*. A principal característica da OI é a fragilidade óssea causada, principalmente, pelas mutações nos genes que sintetizam ou processam o colágeno tipo I, e nos genes responsáveis pela maturação dos osteoblastos. Inicialmente, nós avaliamos duas linhagens de células-tronco mesenquimais (CTMs), extraídas de dois tecidos diferentes, medula óssea (CTM-MO) e tecido adiposo (CTM-TA), a fim de compreender quais das duas melhor exerce um papel osteo reparador sobre os fêmures de camundongos *oim*. Estas células foram aplicadas localmente através dos côndilos femorais dos camundongos *oim*, previamente irradiados. O bioensaio para comparação entre essas duas células apresentou resultados positivos em relação à ação das CTM-TA sobre a melhora da qualidade óssea dos fêmures destes animais, através da dosagem da cadeia $\alpha 1(I)$ do colágeno tipo I, e sobretudo pelos resultados significativos ($P < 0,05$) obtidos na avaliação biomecânica. Desta forma, esta linhagem foi escolhida para o bioensaio de avaliação pré-clínica, associando o transplante alogênico destas células à eletroporação do gene do mGH. As técnicas utilizadas foram baseadas em protocolos pré-clínicos realizados por nosso grupo de terapia gênica, tanto para a melhora fenotípica de modelos GH-deficientes, quanto para a de camundongos *oim* heterozigotos. Os resultados

revelaram que a associação entre a terapia gênica *in vivo* e o transplante das CTM-TA foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo para praticamente todos os parâmetros avaliados, mostrando que estas células possuem sua atividade reparadora, possivelmente, potencializada pela super expressão do mGH. Coletivamente, os dados encontrados neste trabalho abrem novos horizontes para o entendimento da ação das CTM-TA na reparação tecidual, assim como o papel anabolizante do GH sobre a melhora do fenótipo da OI tipo I.

Palavras-chave: osteogênese imperfeita, camundongo *oim*, terapia gênica, terapia celular, células-tronco mesenquimais, hormônio de crescimento, eletrotransfêrencia *in vivo*.

ABSTRACT

GOMES, A. M. ***Electrotransference of the mouse growth hormone gene associated with the administration of mesenchymal stem cells, in a murine model of osteogenesis imperfecta***, 2021. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Pre-clinical and clinical trials of cell and gene therapy have been developed and applied in a very promising manner, through the latest decades, facing the search for the cure or the effective improvement of several genetic disorders. Our Gene Therapy group of the Biotechnology Center, at IPEN, holds vast experience on in vivo delivery of plasmid DNA containing human growth hormone (hGH) and murine (mGH) genes for the treatment of GH-deficient mice, developing protocols that showed very relevant results in the last 10 years. Thus, in this work we propose a novel approach based on the association between in vivo gene therapy and allogeneic transplant of mesenchymal stem cells for treating osteogenesis imperfecta (OI) in a murine model, the oim mice. The main feature of OI is the bone fragility caused, mainly, by mutations in the genes that synthesize or process type I collagen, and in those responsible for osteoblast maturation. Initially, we evaluated two lineages of mesenchymal stem cells (MSCs) extracted from two different tissues, bone marrow (BM-MSC) and adipose tissue (AT-MSC), to comprehend which is the better bone healer on the oim mice femurs. These cells were applied locally through the femoral condyles of previously irradiated oim mice. The bioassay comparing these two types of cells showed positive results regarding the action of AT-MSC for the improvement of the femoral bone quality in these animals, through the dosage of the $\alpha 1(I)$ chain of the type I collagen, and furthermore providing significant results ($P < 0.05$) acquired from biomechanics evaluation. Therefore, this lineage was chosen for the bioassay of pre-clinical evaluation, associating the allogeneic transplant of these cells to the electroporation of the mGH gene. The techniques applied were based on pre-clinical protocols performed by our gene therapy group for the phenotypical improvement of both GH-deficient models and heterozygous oim mice. The results revealed that the association between in vivo gene therapy and AT-MSC transplantation was statistically significant ($P < 0.05$) versus negative control for practically all the evaluated parameters, demonstrating that these cells possess their reparative activity, possibly, potentialized by over

expression of mGH. Collectively, the data reported in this work unveil new horizons for the understanding of the action of AT-MSC in tissue reparation, as well as for the anabolic role of GH over type I OI phenotype improvement.

Keywords: osteogenesis imperfecta, oim mouse, gene therapy, cell therapy, mesenchymal stem cells, growth hormone, in vivo electrotransfer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação genética da osteogênese imperfeita	31
Tabela 2 – Principais características das terapias antirreabsortivas para a osteogênese imperfeita	37
Tabela 3 – Taxas de doses médias e tempos de exposição das irradiações dos camundongos <i>oim</i> realizadas no CETER.	60
Tabela 4 – Interpretação da genotipagem dos camundongos <i>oim</i> , de acordo com o tamanho das bandas das duas reações obtidas, após PCR, em gel de agarose.	71
Tabela 5 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento e por sexo, do bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.....	84
Tabela 6 – Resultados do teste biomecânico, por grupo de tratamento e por sexo, do bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.....	85
Tabela 7 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento, do segundo bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.....	88
Tabela 8 – Resultados, por grupo de tratamento, do segundo bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.	93
Tabela 9 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento, do bioensaio de avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica.	96
Tabela 10 – Resultados do teste biomecânico, por grupo de tratamento, após bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica.	102
Tabela 11 – Dosagens das proteínas, por grupo de tratamento, após bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da tripla hélice do colágeno tipo I, que consiste em duas cadeias do tipo alfa 1, provenientes do gene COL1A1 e uma cadeia do tipo alfa 2, proveniente do gene COL1A2. A formação e estabilidade da tripla hélice são dependentes das sequências repetidas de aminoácidos Gly-X-Y presente nas cadeias. 28
- Figura 2 – Exemplo de mutações no gene COL1A1 do colágeno tipo I. a) Mutação *nonsense* no éxon 47 do gene COL1A1, ocorrendo uma substituição C – T e gerando um *stop* códon prematuro, o que leva à degradação da molécula antes de ser enviada à MEC e ocasiona o fenótipo OI tipo I. b) Mutação *missense* no éxon 15 do gene COL1A1, ocorrendo uma substituição G – A, porém gerando a troca do aminoácido Gly (glicina) por Arg (arginina). A glicina é importante para manutenção da tripla hélice da proteína, ocasionando o fenótipo OI tipo III. 29
- Figura 3 – Representação esquemática da mutação que ocorre nos camundongos *oim* em comparação ao *wild type*. A deleção da guanina (G) nos dois alelos altera o quadro de leitura do COL1A2, resultando na degradação dessa cadeia e a formação de um colágeno homotrimérico formado pela associação de três cadeias $\alpha 1$ 33
- Figura 4 – Representação da estrutura dos pró-colágenos e colágenos de acordo com o genótipo. O animal wild type possui 100% de colágeno normal heterotrimérico, enquanto o heterozigoto possui quantidades reduzidas de colágeno normal heterotrimérico, e o homozigoto possui colágeno anormal homotrimérico. 34
- Figura 5 – Representação esquemática das técnicas *ex vivo* e *in vivo* da terapia gênica. A técnica *in vivo* consiste na introdução do DNA por meio de vetores de expressão através de injeções diretamente no indivíduo. Enquanto a técnica *ex vivo* consiste na retirada de células do paciente, que sofrerão modificações genéticas, por meio de edição gênica e, após cultura, serão readministradas no paciente. 42
- Figura 6 – Representação esquemática das principais características das células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são caracterizadas por sua capacidade de auto-renovação, diferenciação em múltiplas linhagens celulares e por expressarem marcadores de superfície específicos tanto em humanos, quanto em camundongos. 47
- Figura 7 – Representação esquemática da preparação das duas reações de PCR a partir da mesma amostra de DNA e as etapas do método. 7A. Para cada reação de PCR são adicionados ao tubo de 0,2 mL quantidades padronizadas de DNA extraído a partir de tecido, mix para PCR e *primers*. As reações diferem apenas na adição de *primers* específicos B21-*oim* (Reação 1) e B21-*wt* (Reação 2). 7B. Etapas da PCR: desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão da fita. 53
- Figura 8 – Heredograma esquematizando os cruzamentos entre camundongos normais e *oim* até a obtenção da linhagem heterozigota, selecionada para a experimentação. 54
- Figura 9 – Mapa do pUC-UBI-mGH de 5830 pb, contendo a sequência do DNA genômico mGH de 1,6 kb entre os sítios de restrição BamHI e EcoRI, o promotor da Ubiquitina-C humana e o gene de resistência à ampicilina. 55
- Figura 10 – Representação esquemática do processo de eletroporação. É aplicada uma corrente elétrica sobre o tecido alvo que promove a abertura de poros transientes na membrana celular, proporcionando a passagem de moléculas, como os plasmídeos. 56
- Figura 11 – Irradiação dos camundongos. 11A. Camundongos dentro dos tubos de PVC, fechados e posicionados no suporte para irradiação. 11B. Animais posicionados a 20 cm da fonte panorâmica de radiação gama (Co^{60}). 60
- Figura 12 – Local de aplicação das CTMs. O joelho dos animais foi flexionado a 90° e uma agulha de calibre 26, acoplada a uma seringa de 1 mL, foi inserida na região do côndilo femoral. 61

Figura 13 – Organização dos grupos para o bioensaio de comparação entre as células provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA): grupo controle negativo, grupo CTM-TA e grupo CTM-MO.....	62
Figura 14 – Representação esquemática do delineamento experimental do bioensaio para comparação entre as CTMs do tecido adiposo e da medula óssea.....	63
Figura 15 – Organização dos grupos do segundo bioensaio para comparação entre as células provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA): grupo controle negativo, grupo CTM-TA, grupo CTM-MO e grupo controle positivo.....	63
Figura 16 – Organização dos grupos do bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica. 1. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados apenas com as CTMs. 2. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados com as CTMs e a eletroporação do DNA plasmidial. 3. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados apenas com eletroporação do DNA plasmidial. 4. Grupo controle negativo de camundongos oim heterozigotos que receberam PBS. 5. Grupo controle positivo de camundongos C57BL/6J.....	64
Figura 17 – Representação esquemática do delineamento experimental do bioensaio para avaliação pré-clínica. 60' refere-se aos 60 dias após a irradiação e transplante das CTMs, enquanto 60'' refere-se aos 60 dias após a primeira eletroporação.....	65
Figura 18 – Esquema das metodologias empregadas para obtenção da densidade óssea e do comprimento dos fêmures. 18A. Escolha de cinco regiões de interesse (ROIs), de mesmo comprimento, em cada fêmur, compreendendo as epífises e metáfises distais e proximais para cálculo da média da densidade óssea, obtida pelo <i>software</i> integrado ao equipado de raio-X. 18B. Obtenção do comprimento total do fêmur (epífise distal a epífise proximal) através do <i>software Image J</i>	66
Figura 19 – Ilustração do teste de flexão realizado na UNIFESP, unidade Santos. 19A. Fêmur centralizado sobre o apoio de 8 mm. A força está sendo aplicada na região antero-posterior na parte central da diáfise. 19B. Momento da fratura. A força para de ser aplicada e o aparelho registra os dados.....	67
Figura 20 – Gel de agarose exemplificando a genotipagem de camundongos <i>oim</i> . (<i>Marker</i>) Marcador de peso molecular de 100 pb, (M1) macho 1 – homozigoto (<i>oim/oim</i>) para OI, (M2) macho 2 – heterozigoto (<i>oim/wt</i>) para OI, (M3) macho 3 – normal (<i>wt/wt</i>).....	71
Figura 21 – Imunofenotipagem das CTM-MO, mostrando a expressão de marcadores de superfície atribuídos às CTMs murinas, como CD 29, CD 44 e CD 105.	72
Figura 22 – Imunofenotipagem das CTM-TA, mostrando a expressão de marcadores de superfície atribuídos às CTMs murinas, como CD 29 e Sca-1.....	73
Figura 23 – Diferenciação das CTM-MO. 23A. Coloração por <i>Oil red</i> , O demonstrando os depósitos de lipídeos em vermelho. 23B. Coloração por <i>Alizarin red S</i> demonstrando os cristais de cálcio..	74
Figura 24 – Diferenciação das CTM-TA. 24A. Coloração por <i>Oil red</i> O demonstrando os depósitos de lipídeos, com controle negativo (CTRL-). 24B. Coloração por <i>Alizarin red S</i> demonstrando os cristais de cálcio, com controle negativo (CTRL-).	74
Figura 25 – Visualização das CTM-MO, em passagem 10, em microscópio de fluorescência (<i>Nikon Eclipse TS100-F</i>), com aumento de 100x. 25A. Células na luz branca. 25B. Células expressando intensa fluorescência vermelha, após excitação com luz em comprimento de onda de 550 nm....	76
Figura 26 – Visualização das CTM-TA, em passagem 9, em microscópio de fluorescência (<i>Nikon Eclipse TS100-F</i>), com aumento de 100x. 25A. Células na luz branca. 25B. Células expressando intensa fluorescência vermelha, após excitação com luz em comprimento de onda de 550 nm....	77

Figura 27 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos <i>oim</i> , 20 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. *P = 0,0011, quando comparamos o grupo que recebeu CTM-MO e o grupo controle negativo (PBS).	78
Figura 28 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos <i>oim</i> , 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. Não houve diferença significativa entre os grupos.	79
Figura 29 – Variação de peso dos camundongos <i>oim</i> , ao longo dos 45 dias, após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. Não houve diferença significativa entre os grupos.	80
Figura 30 – Variação do comprimento dos fêmures de camundongos <i>oim</i> , após 45 dias de aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. *P=0,0301, quando comparamos o grupo CTM-MO e o grupo controle negativo (PBS).	80
Figura 31 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures dos camundongos <i>oim</i> , após 45 dias da aplicação das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA) ou aplicação de PBS. 31A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura. 31B. Extensão da flexão até a fratura, *P= 0,0028 comparando os grupos CTM-TA e controle negativo. 31C. Tempo até a fratura, *P= 0,0032, também comparando os grupos CTM-TA e controle negativo.	81
Figura 32 – Determinação do colágeno COL1A1 dos camundongos <i>oim</i> tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS). Houve aumento significativo da concentração do COL1A1 no grupo que recebeu CTM-MO em comparação ao grupo que recebeu CTM-TA, *P=0,0281.	82
Figura 33 – Determinação do colágeno COL1A2 dos camundongos <i>oim</i> tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS). Não houve significância estatística entre os grupos.	83
Figura 34 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos <i>oim</i> machos, 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. *P = 0,0025, quando comparamos o grupo controle negativo (PBS) e o grupo normal, composto por camundongos C57BL/6J.	86
Figura 35 – Variação de peso dos camundongos <i>oim</i> machos, ao longo dos 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais, além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença significativa entre os grupos.	87
Figura 36 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures de camundongos <i>oim</i> machos, após a aplicação das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA) ou aplicação de PBS, além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. 36A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura. 36B. Extensão da flexão até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com *P = 0,0002; teste t nos demais grupos: **P= 0,0248 CTM-TA <i>versus</i> PBS; ***P < 0,0001 normal <i>versus</i> PBS; ****P = 0,0440 normal <i>versus</i> CTM-TA; e *****P = 0,0014 normal <i>versus</i> CTM-MO. 36C. Tempo até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com *P= 0,0007; teste t nos demais grupos: **P= 0,0387 CTM-TA <i>versus</i> PBS; ***P = 0,0002 normal <i>versus</i> PBS; ****P = 0,0023 normal <i>versus</i> CTM-MO.	90
Figura 37 – Determinação da cadeia COL1A1 nos camundongos <i>oim</i> machos tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS) e grupo normal (controle positivo), composto por camundongos C57BL/6J. Houve diferença significativa entre os grupos através do teste ANOVA, com *P=0,0311; e pelo teste t entre o grupo que recebeu CTM-MO em comparação ao grupo que recebeu CTM-TA, **P=0,0346 e o grupo controle positivo, com ***P=0,0380.	91

Figura 38 – Determinação da cadeia COL1A2 nos camundongos *oim* tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS) e grupo normal (controle positivo). Houve diferença significativa apenas entre o grupo controle negativo e o CTM-MO, com $*P = 0,0320$ 92

Figura 39 – Variação de peso dos camundongos *oim* ao longo dos 60 dias após o tratamento com as células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA), associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA), além dos grupos controle negativo (PBS) ou positivo (normal, composto por camundongos C57BL/6J). 95

Figura 40 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures dos camundongos *oim* 60 dias após o tratamento com as células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA), associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA), além dos grupos controle negativo (PBS) ou positivo (normal, composto por camundongos C57BL/6J). 40A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura, com valor significativo na comparação CTM-TA + DNA *versus* PBS, $*P = 0,0420$. 40B. Extensão da flexão até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com $*P = 0,0080$; teste t nos demais grupos: $**P = 0,0145$ CTM-TA + DNA *versus* PBS; $***P = 0,0012$ normal *versus* PBS; $****P = 0,0415$ CTM-TA + DNA *versus* DNA; e $*****P = 0,0110$ normal *versus* DNA. 40C. Tempo até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com $*P = 0,0100$; teste t nos demais grupos: $**P = 0,0157$ CTM-TA + DNA *versus* PBS; $***P = 0,0006$ normal *versus* PBS; $****P = 0,0419$ normal *versus* CTM-TA; e $*****P = 0,0147$ normal *versus* DNA. 98

Figura 41 – Quantificação do mGH sérico após 60 dias de bioensaio, em camundongos *oim* heterozigotos tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos. 99

Figura 42 – Quantificação do IGF-I sérico após 60 dias de bioensaio, em camundongos *oim* heterozigotos tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos. 99

Figura 43 – Determinação dos níveis de expressão da cadeia COL1A1 nos camundongos *oim* tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos. 100

Figura 44 – Expressão da cadeia COL1A2 nos camundongos *oim* tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Houve diferença significativa entre os grupos através do teste ANOVA, com $*P = 0,0044$; e pelo teste t entre o grupo que recebeu CTM-TA em comparação ao grupo que recebeu DNA ($**P = 0,0299$); entre o grupo CTM-TA + DNA em relação aos grupos DNA ($***P < 0,0001$) e o grupo PBS ($****P = 0,0274$); e entre os grupos PBS ($*****P = 0,0015$) e normal ($*****P = 0,0017$) em relação ao grupo DNA. 101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – micrograma(s)

µL – microlitro(s)

µM – micro molar

µm – micrometro(s)

°C – Celsius

AAVs – adenovírus associado

AXIN2 – axis inhibition protein 2 gene

bGH – *bovine growth hormone*

BMPs – *Bone Morphogenetic Proteins*

BMP1 – *Bone Morphogenetic Protein 1*

BMP2 – *Bone Morphogenetic Protein 2*

BR – Brasil

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – centímetro (s)

CMO – conteúdo mineral ósseo

CO₂ – dióxido de carbono

CO⁶⁰ – Cobalto 60

COL1A1 – cadeia alfa-1 do colágeno tipo I

COL1A2 – cadeia alfa-2 do colágeno tipo I

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREB3L1 – *cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) responsive element binding protein 3 like 1*

CRTAP – *cartilage associated protein*

CTMs – células-tronco mesenquimal(s)

Dlx5 – *distal-less homeobox 5*

DMEM/F12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium: nutrient mixture F-12*

DMO – densidade mineral óssea

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EDTA – *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

FKBP10 – *FK506-binding protein 10*

g – grama (s)

gDNA – DNA genômico

GHRKO – *growth hormone receptor knockout*

Gy – gray (s)

GM – gabinete do ministério

h – hora (s)

hGH – *human growth hormone*

IFITMs – *interferon-induced transmembranes*

kDa – *kilo Dalton* (s)

iMSCs – *induced mesenchymal stem cells*

iPSCs – *induced pluripotent stem cells*

L – litro (s)

Lit - *little*

M – molar

mA – milliampere (s)

MBTPS2 – *membrane bound transcription factor peptidase, site 2*

MEC – matriz extracelular

mGH – *mouse growth hormone*

mIGF-I – *mouse insulin-like growth factor 1*

min – minuto (s)

miRNA - microRNA

mm – milímetro (s)

N – Newton (s)

N₂ – nitrogênio

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

ng – nanograma (s)

nm – nanômetro(s)

OI – Osteogênese Imperfeita

oim – *osteogenesis imperfecta murine*

Osx – *osterix/SP7 transcription factor*

P3H1 – *prolyl 3-hydroxylase 1*

pb – par (s) de base

PBS – *phosphate buffer saline*

pH – potencial hidrogeniônico

PLOD2 – *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2*

pmol – picomol

PPIB – *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B*

RNA – *ribonucleic acid*

RPM – rotação (s) por minuto

RUNX2 – *runt-related transcription factor 2*

s – segundo (s)

SAS/MS – Secretaria de assistência à saúde/ Ministério da Saúde

SERPINF1 – *serpin family F member 1*

SERPINH1 – *serpin family H member 1*

SFB – soro fetal bovino

SP7 – *Sp7 transcription factor*

SPARC – *secreted protein acidic and cysteine rich*

SUS – Sistema Único de Saúde

Tm – temperatura de anelamento

TMEM38B – *transmembrane protein 38B*

U – unidade (s)

V – Volt (s)

Wnt – via de sinalização Wnt

WNT1 – *Wnt family member 1*

Wt – *wild type*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo principal	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	Osteogênese Imperfeita e colágeno tipo I	26
3.2	Tipos de OI	30
3.3	Modelo murino para OI	32
3.4	Diagnóstico e tratamento para OI	35
3.5	Tratamento da OI no Brasil	38
3.6	Utilização do hormônio de crescimento para tratamento da OI	39
3.7	Terapia gênica	41
3.8	Experiência do grupo de terapia gênica no CEBIO	44
3.9	Terapia celular	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Animais	51
4.2	Genotipagem dos camundongos oim	52
4.3	Plasmídeo	54
4.4	Eletrotransferência	55
4.5	Extração, isolamento, caracterização e cultura das células-tronco mesenquimais de camundongo	57
4.6	Irradiação dos animais para aplicação das CTMs	59
4.7	Aplicação das CTMs nos côndilos femorais dos camundongos oim	60
4.8	Bioensaio para comparação entre as CTM-MO e CTM-TA quanto à melhora fenotípica da OI	62
4.9	Bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica	63
4.10	Medida do comprimento e da densidade óssea do fêmur	65
4.11	Determinação da fragilidade óssea (teste biomecânico)	67
4.12	Quantificação das cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno tipo I	68
4.13	Dosagem de mGH e de mIGF-I	68
4.14	Análise estatística	68

5	RESULTADOS.....	70
5.1	Genotipagem.....	70
5.2	Extração, caracterização e diferenciação das CTMs no CETEC e Hospital Albert Einstein	71
5.3	Cultura das CTMs no IPEN	75
5.4	Bionsaio para comparação entre as CTM-MO e as CTM-TA.....	78
5.5	Segundo bioensaio para comparação entre as CTM-MO e as CTM-TA...	85
5.6	Bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica.....	94
6	DISCUSSÃO	104
7	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Abordagens terapêuticas e avanços em pesquisas baseadas em terapias celulares e gênicas têm representado, ultimamente, um aumento significativo na área médica, especialmente para tratamentos de desordens, como câncer e doenças monogênicas, que até o presente momento não apresentam cura. Além disso, muitas dessas doenças genéticas possuem múltiplos fenótipos, devido às suas complexidades fisiológicas, cujo tratamentos, de maneira geral, são apenas para controle dos sintomas, podendo exigir diversas abordagens terapêuticas. Embora benéficas, as intervenções são temporárias, e em sua maioria, subótimas, recorrentes, dispendiosas e demoradas (PASTERNAK, 2002). Diante disso, a busca por abordagens gênicas e celulares torna-se cada vez mais necessária para o desenvolvimento de tratamentos de desordens complexas, como, por exemplo, a osteogênese imperfeita (OI).

De modo geral, a OI é uma desordem que atinge o tecido conjuntivo como um todo, e é causada por mutações autossômicas dominantes e recessivas, com diferentes padrões de herança, sendo a maioria (mais de 80% dos casos) causada por mutações nos genes que codificam o colágeno tipo I, o principal componente da matriz extracelular do osso e da pele (KANG et al., 2017; MARINI et al., 2017). Consequentemente, seu fenótipo é caracterizado por fragilidade, deformidade e baixa densidade óssea, assim como outras manifestações clínicas que variam de acordo com o tipo da mutação e a severidade da doença. Atualmente foram descritos e categorizados 18 tipos de OI, variáveis de acordo com o tipo de mutação e o fenótipo heterogêneo da doença (MARINI et al., 2017).

Como não há cura para a OI, diferentes abordagens terapêuticas são usadas apenas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e, por esta razão, há a necessidade de estudar novos tratamentos, incluindo os gênicos e celulares, que possam servir de base para potenciais ensaios clínicos (MARINI et al., 2017; ROSSI et al., 2019).

Diante desta perspectiva, protocolos pré-clínicos e clínicos para transplante de células-tronco e terapia gênica *ex vivo*, já foram desenvolvidos e apresentaram melhora nas características fenotípicas da doença em modelos murinos e em humanos (PEREIRA et al., 1998; HORWITZ et al., 1999, 2001 e 2002; CHAMBERLAIN et al., 2004 e 2008; LI F. et al., 2010; DEYLE et al., 2011; OTSURU

et al., 2012; RANZONI et al., 2016; OTSURU et al., 2017; SINDER et al., 2019; GÖTHERSTRÖM & WALTHER-JALLOW, 2020). Entretanto, embora essas abordagens apresentem um futuro promissor para o tratamento da OI, mais ensaios pré-clínicos e clínicos ainda são necessários para assegurar a longevidade, a segurança e a eficácia dessas estratégias.

No Brasil, os protocolos clínicos e as diretrizes terapêuticas divulgados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da OI são baseados em abordagens multidisciplinares, como a administração de fármacos, cirurgias e fisioterapias, variando a terapêutica de acordo com a expressão clínica da doença. Compete ao Sistema Único de Saúde (SUS), desde 2001, disponibilizar o tratamento à população portadora da doença (BRASIL, 2013). Entretanto, assim como as outras abordagens já estabelecidas e aprovadas internacionalmente, esta refere-se apenas à melhora sintomática da doença.

Diante disso, neste trabalho, buscamos, por meio da associação entre a terapia gênica *in vivo* e o transplante celular de células-tronco mesenquimais, alternativas que melhorem, futuramente, a qualidade terapêutica de indivíduos portadores de OI, trazendo novos horizontes para esta doença tão complexa, hereditária e sem cura.

Nossa proposta é baseada na experiência do nosso grupo de terapia gênica, aplicada anteriormente para outra doença monogênica, a deficiência do hormônio de crescimento (OLIVEIRA et al., 2010; HIGUTI et al., 2012; CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016; CECCHI et al., 2017, LIMA et al., 2020). Assim como, na aplicação inédita desta abordagem de entrega *in vivo* de DNA plasmidial contendo o gene do hormônio de crescimento murino (mGH) para tratamento de OI do tipo I, um ensaio pré-clínico utilizando um modelo animal de OI (JESUS, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

De acordo com as considerações acima, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a melhora do fenótipo da osteogênese imperfeita (OI) do tipo I em modelo murino, os camundongos *oim*, após administração do gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH), via injeção seguida por eletrotransferência muscular, em combinação com o tratamento pela infusão de células-tronco mesenquimais murinas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vivo* a melhor fonte de células-tronco mesenquimais murinas: proveniente da medula óssea ou do tecido adiposo pela infusão em camundongos *oim* heterozigotos;
- Realizar bioensaio *in vivo* nos mesmos camundongos associando a eletrotransferência plasmidial e a infusão das células;
- Determinar parâmetros de melhora do fenótipo da OI nos camundongos tratados: aumento de peso, variação corporal longitudinal (comprimento total do corpo e da cauda), comprimento do fêmur, incremento da densidade mineral óssea e rigidez do osso, além da quantificação de COL1A1, COL1A2, mGH e mIGF-I.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Osteogênese Imperfeita e colágeno tipo I

A OI ou doença dos ossos frágeis é um distúrbio hereditário do tecido conjuntivo, cuja maior manifestação é no osso e na pele. É caracterizada pela fragilidade e baixa densidade óssea, deformidades no esqueleto e deficiências no crescimento, além de outras manifestações sistêmicas extra-ósseas muito variadas, tais como esclera azulada, dentinogênese imperfeita, perda auditiva, relaxamento excessivo de ligamentos e pele, diminuição da função pulmonar e regurgitação da válvula cardíaca (PEDRONI, 2012; LASMAR et al., 2013; FORLINO & MARINI, 2016; KANG et al., 2017; MARINI et al., 2017).

Apresenta incidência estimada de 1 em 10.000 nascimentos e é associada, em sua maioria, à anormalidade na síntese e/ou na estrutura do colágeno tipo I (MARINI et al., 2017). Estas anormalidades são provenientes de herança autossômica dominante e são causadas por mutações nos genes COL1A1 no cromossomo 17 e COL1A2 no cromossomo sete, que codificam, respectivamente, as cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ do colágeno tipo I. A maioria dos pacientes são heterozigotos para mutações nestes genes, não havendo diferença na prevalência da doença entre os sexos (PEDRONI, 2012; MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016; MARINI et al., 2017).

O colágeno faz parte da maior classe de proteínas fibrosas insolúveis encontradas na matriz extracelular e nos tecidos conectivos (VARGAS et al., 1997). De todos os 28 diferentes tipos de colágenos descritos atualmente em humanos (SHARMA et al., 2017), o colágeno tipo I é o mais abundante, e está amplamente distribuído por todo o organismo, sendo o maior constituinte da matriz extracelular (MEC) da pele, ossos, tendões, córnea, pulmão, coração e vasos sanguíneos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; SHARMA et al., 2017). Segundo VARGAS e colaboradores (1997), o colágeno tipo I constitui cerca de 90% da matriz extracelular óssea.

O colágeno tipo I é formado pelo entrelaçamento em tripla hélice (heterotrímero) de três cadeias peptídicas, denominadas cadeias alfa: duas cadeias do tipo $\alpha 1(I)$ e uma cadeia do tipo $\alpha 2(I)$ (Figura 1), que garantem propriedades físicas e biológicas, como rigidez, solidez e estabilidade das fibras de colágeno

(MILLINGTON-WARD et al., 2005; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Essas cadeias alfa são organizadas em alfa-hélice por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, com giro à direita, formando a estrutura em tripla hélice (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Entretanto, a chave para a formação dessa estrutura é uma sequência de repetição de 1014 aminoácidos Gly-X-Y (em que Gly é glicina, X é frequentemente prolina e Y é hidroxiprolina) (Figura 1). A glicina tem um papel importante, uma vez que é necessária em cada posição de três aminoácidos para permitir a formação e a estabilidade da tripla hélice (MILLINGTON-WARD et al., 2005).

Durante a síntese das cadeias peptídicas, mutações *nonsense*, provenientes da substituição de um par de bases por outro, induzem à introdução de um *stop codon* precoce na sequência proteica, produzindo, assim, uma cadeia peptídica instável que é removida, levando a uma diminuição da quantidade de colágeno tipo I estruturalmente normal e resultando num fenótipo moderado da OI (Figura 2a). Mutações *missense*, provenientes da substituição de um par de bases por outro, com a formação de um códon que codifica um aminoácido diferente do original (o mais comum é a substituição de uma glicina), causam, porém, mudanças estruturais nas cadeias peptídicas, afetando a associação das cadeias alfa, a formação da tripla hélice, a secreção e a formação da fibrila, resultando, geralmente, em fenótipos mais graves da doença, como a OI do tipo III (Figura 2b), incluindo o fenótipo letal da OI tipo II (KANETO, 2011; PEDRONI, 2012).

Figura 1 – Representação esquemática da tripla hélice do colágeno tipo I, que consiste em duas cadeias do tipo alfa 1, provenientes do gene COL1A1 e uma cadeia do tipo alfa 2, proveniente do gene COL1A2. A formação e estabilidade da tripla hélice são dependentes das sequências repetidas de aminoácidos Gly-X-Y presente nas cadeias.

Fonte: Adaptado de MILLINGTON-WARD et al., 2005.

Figura 2 – Exemplo de mutações no gene COL1A1 do colágeno tipo I. a) Mutação *nonsense* no éxon 47 do gene COL1A1, ocorrendo uma substituição C – T e gerando um *stop* códon prematuro, o que leva à degradação da molécula antes de ser enviada à MEC e ocasiona o fenótipo OI tipo I. b) Mutação *missense* no éxon 15 do gene COL1A1, ocorrendo uma substituição G – A, porém gerando a troca do aminoácido Gly (glicina) por Arg (arginina). A glicina é importante para manutenção da tripla hélice da proteína, ocasionando o fenótipo OI tipo III.

a) Mutação *nonsense*

COL1A1 - Éxon 47

Alelo 1 5' - GGT CCC TCT GGA GCC TCT GGT CCT GCT GGT CCC CGA - 3'

Alelo 2 5' - GGT CCC TCT GGA GCC TCT GGT CCT GCT GGT CCC TGA - 3'

Stop códon prematuro

b) Mutação *missense*

COL1A1 - Éxon 15

Alelo 1 5' - GGT GCT CGT GGA AAT GAT GGT GCT ACT GGT GCT GCC ^{Gly} GGG CCC CCT - 3'

Alelo 2 5' - GGT GCT CGT GGA AAT GAT GGT GCT ACT GGT GCT GCC ^{Arg} AGG CCC CCT - 3'

Fonte: Adaptado de PRUCHNO et al., 1991; WILLING et al., 1994 e MILLINGTON-WARD et al., 2005.

3.2 Tipos de OI

Devido à variabilidade fenotípica considerável, SILLANCE e colaboradores (1979) estabeleceram uma classificação da OI, dividindo-a em quatro subtipos, baseada em características clínicas, genéticas e radiológicas. A forma mais leve e comum é a OI do tipo I, com fragilidade e baixa densidade óssea e escleras azuladas; a OI tipo II é a forma mais severa, perinatal letal; a OI do tipo III é uma forma grave e progressivamente deformante, com esclera normal; a OI tipo IV é a forma de gravidade moderada menos comum, com esclera normal (SILLANCE, et al., 1979; PEDRONI, 2012; MARINI & SMITH, 2015; MARINI et al., 2017). Na última década, foram incluídos outros subtipos da doença, de herança autossômica recessiva, dominante e ligadas ao cromossomo X: OI tipo V a XVIII. Porém, estes subtipos estão relacionados a mutações que ocorrem em genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese, processamento, modificações pós-traducionais e secreção do colágeno tipo I, bem como em proteínas que regulam a diferenciação e a atividade das células formadoras de osso, e que causam fenótipos heterogêneos da doença (Tabela 1) (PEDRONI, 2012; FORLINO & MARINI, 2016; KANG et al., 2017; MARINI et al., 2017).

A OI do tipo I, nosso fenótipo de interesse, é causada, na maioria das vezes, por mutações *nonsense* em um dos alelos do gene COL1A1, gerando um *stop codon* prematuro, e levando a uma diminuição, de cerca de 50%, da quantidade de colágeno estruturalmente normal na matriz extracelular. O genótipo para esse fenótipo é heterozigoto, no qual apenas o alelo não mutado produz colágeno normal tipo I, enquanto o alelo mutado produz defeitos estruturais na cadeia peptídica do tipo $\alpha 1(I)$, resultando na síntese de colágenos anormais, e que, portanto, não são enviados à MEC (Figura 2a) (WILLING et al., 1994, 1996; MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016; KANG et al., 2017; MARINI et al., 2017).

Tabela 1 – Classificação genética da osteogênese imperfeita

Gene mutado*	Herança	Tipo (baseada na classificação genética)	Características Clínicas
Comprometimento da síntese ou estrutura do colágeno			
COL1A1 ou COL1A2	AD**	I, II, III, ou IV	Tipo I – escleras azuladas, estatura quase normal, perda auditiva de início tardio; Tipo II – forma perinatal letal; Tipo III – deformidade progressiva; Tipo IV – forma mais severa do que o tipo I e menos severa do que os tipos II e III, com escleras brancas, baixa estatura, deformidade óssea e dentinogênese imperfeita.
Comprometimento da mineralização óssea			
IFITMs	AD	V	Deformidade esquelética normal a grave, ossificação da membrana interóssea, deslocamento da cabeça do rádio, esclera normal para azul, e às vezes, perda auditiva.
SERPINF1	AR***	VI	Normal a grave deformidade esquelética, presença de osteoide, aparência de escama de peixe de padrão ósseo lamelar, com início na infância.
Modificações pós-traducionais de colágeno anormal			
CRTAP	AR	VII	Rizomelia severa com esclera branca.
P3H1	AR	VIII	
PPIB	AR	IX	Deformidade óssea severa com esclera cinza.
Processamento do colágeno comprometido e reticulação do DNA			
SERPINH1	AR	X	Deformidade óssea severa, esclera azulada, dentinogênese imperfeita, anormalidades na pele e hérnia inguinal.
FKBP10	AR	XI	Deformidade esquelética leve a grave, esclera normal a cinza e contraturas congênicas.
PLOD2	AR	Sem tipo	Deformidades esqueléticas moderadas a graves e contraturas articulares progressivas.
BMP1	AR	XII	Deformidade esquelética leve a grave e hérnia umbilical.
Diferenciação e função alterada dos osteoblastos			
SP7	AR	XIII	Deformidade esquelética grave com erupção dentária retardada e hipoplasia facial.
TMEM38B	AR	XIV	Deformidade óssea grave com esclera normal a azul.
WNT1	AR/AD	XV	Anormalidades esqueléticas graves, esclera branca e possíveis defeitos neurológicos.
CREB3L1	AR	XVI	Deformidade óssea severa.
SPARC	AR	XVII	Fragilidade óssea severa progressiva.
MBTPS2	XR****	XVIII	Deformidade esquelética moderada a grave, esclera azul claro, escoliose e deformidades peitorais.

* Os genes foram descritos na lista de abreviações;

AD – Autossômico dominante; *AR – Autossômico recessivo; ****XR – Ligado ao X recessivo.

Fonte: Modificado de MARINI et al., 2017.

3.3 Modelo murino para OI

Um dos modelos murinos comumente utilizado para a OI humana, o camundongo *oim* (*osteogenesis imperfecta murine*), apresenta fenótipo bastante semelhante ao humano, podendo mimetizar características leves a severas da doença e é, portanto, amplamente utilizado para estudar as características ósseas e desenvolver tratamentos (CHIPMAN et al., 1993; CARRIERO et al., 2014; LI et al., 2016). A mutação no modelo animal ocorre naturalmente, porém, na cadeia $\alpha 2(I)$ do colágeno I codificada pelo gene COL1A2, no qual há a deleção de um único nucleotídeo na posição 3983 (guanina), no éxon 52, causando um *frameshift* dos 48 aminoácidos finais na extremidade carboxi-terminal (C-terminal) da cadeia peptídica (C-propeptídeo). Isso resulta na formação de um novo *stop* códon e consequentemente na adição de um aminoácido extra na cadeia, além de tornar os 48 aminoácidos originais, incorretos (CHIPMAN et al., 1993). Desta forma, inibe a associação da cadeia $\alpha 2(I)$ com as cadeias $\alpha 1(I)$, resultando na sua degradação e no acúmulo de colágeno homotrimérico na MEC, formado apenas pela associação das cadeias $\alpha 1(I)$ (Figura 3) (CHIPMAN et al., 1993; MCBRIDE & SHAPIRO, 1994).

Camundongos homozigotos para a OI (*oim/oim*) apresentam colágeno homotrimérico composto por três cadeias $\alpha 1(I)$, diferentemente do tipo selvagem (*wild type* - *wt*), heterotrimérico, composto por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma $\alpha 2(I)$ (Figura 4) (CHIPMAN, et al., 1993; CARRIERO, et al., 2014; LI, et al.; 2016). O homozigoto apresenta fraturas esqueléticas espontâneas, osteopenia aguda, deformidades ósseas e diminuição do tamanho corporal, podendo ser identificado visivelmente entre o nascimento e a idade de desmame (CHIPMAN et al., 1993).

Os heterozigotos (*oim/wt*) possuem a mesma mutação na cadeia $\alpha 2(I)$ no gene COL1A2, porém possuem também o gene não mutado em um de seus alelos, expressando uma quantidade reduzida de colágeno tipo I estruturalmente normal (Figura 4). Isto resulta, assim, num fenótipo para OI similar ao humano do tipo I, com osteopenia menos grave e características mecânicas e morfológicas intermediárias entre *oim/oim* e *wt* (CHIPMAN et al., 1993; CARRIERO et al., 2014; LI et al.; 2016). Embora visivelmente estes animais não sejam tão diferentes do *wild type*, quanto ao peso, ausência de deformidades e fraturas espontâneas, apresentam propriedades biomecânicas intermediárias entre o homozigoto e o *wild type*, com organização do tecido ósseo secundário (lamelar) deficiente, leve

redução da espessura cortical e redução da força mecânica quando submetidos à baixas cargas, caracterizando-se assim como modelo para formas leves de osteogênese imperfeita (SABAN et al., 1996).

Figura 3 – Representação esquemática da mutação que ocorre nos camundongos *oim* em comparação ao *wild type*. A deleção da guanina (G) nos dois alelos altera o quadro de leitura do COL1A2, resultando na degradação dessa cadeia e a formação de um colágeno homotrimérico formado pela associação de três cadeias $\alpha 1$.

Mus musculus COL1A2

Wild type 5' - AAA AAG ACA AAT GAA TGG GGC AAG ACA ATC ATT GAA TAC AAA - 3'

oim/oim 5' - AAA AAG ^{Deleção} ACA AAT GAA TGG GGC AAG ACA ATC ATT GAA TAC AAA - 3'

5' - AAA AAA CAA ATG AAT GGG GCA AGA CAA TCA TTG AAT ACA AA - 3'

Deslocamento do quadro de leitura

Camundongo wild type

Camundongo *oim* (*oim/oim*)

Fonte: Autor da dissertação

Figura 4 – Representação da estrutura dos pró-colágenos e colágenos de acordo com o genótipo. O animal *wild type* possui 100% de colágeno normal heterotrimérico, enquanto o heterozigoto possui quantidades reduzidas de colágeno normal heterotrimérico, e o homozigoto possui colágeno anormal homotrimérico.

Fonte: Autor da dissertação

3.4 Diagnóstico e tratamento para OI

O diagnóstico da OI geralmente depende do histórico familiar e de características clínicas, como fratura(s) durante o período pré-natal, no nascimento ou no início da infância, podendo ser confirmado utilizando testes genéticos. Como não há cura para a OI, os tratamentos são baseados nos sintomas e são realizados conforme o tipo e a gravidade da doença, geralmente envolvendo equipe multidisciplinar e diferentes abordagens: fisioterapêutica, cirúrgica e pela administração de fármacos (PEDRONI, 2012; MARINI et al., 2017). O principal objetivo das abordagens fisioterápicas e cirúrgicas é promover e manter o funcionamento das habilidades motoras, a fim de proporcionar maior qualidade de vida aos pacientes (MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016).

Já as terapias farmacológicas são baseadas em terapias inicialmente designadas ao tratamento de osteoporose, visando a melhora da massa óssea e a diminuição de fraturas. Essas terapias estão divididas atualmente em tratamentos antirreabsortivos e anabólicos, variando de acordo com a classificação clínica e idade dos pacientes (MARINI et al., 2017; ROSSI et al., 2019).

O grupo dos bisfosfonatos (Pamidronato, Alendronato, Residronato e Ácido Zoledrônico) faz parte dos tratamentos antirreabsortivos, e são medicamentos usualmente utilizados na prevenção e tratamento da osteoporose. Atuam na indução de apoptose dos osteoclastos, inibindo sua atividade na reabsorção óssea, o que aumenta a deposição de cristais de hidroxapatita na matriz óssea, promovendo aumento da densidade mineral óssea (DMO) e melhora na arquitetura óssea, e até certo ponto reduzindo a incidência de fraturas (PEDRONI, 2012; MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016; MARINI et al., 2017; ROSSI et al., 2019). Entretanto, há uma crescente preocupação quanto ao seu uso a longo prazo, uma vez que após a administração, estes fármacos ficam concentrados na matriz óssea podendo residir ali por meses ou anos. Consequentemente, ocorre diminuição do *turnover* ósseo por longos períodos, podendo inibir, secundariamente, a formação óssea (MARINI et al., 2017; ROSSI et al., 2019). Além disso, segundo JELIN e colaboradores (2017), os bisfosfonatos tornam-se menos eficazes após 2-4 anos de tratamento continuado.

Foi observado em ensaios com animais, que após a administração de bisfosfonatos, por períodos prolongados, há uma redução na qualidade óssea,

causando aumento da sua fragilidade (MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016). Além disso, foi observado também que em crianças não há melhora na laxidade dos ligamentos, que é um dos principais contribuintes para a escoliose na OI. Ademais, há outras preocupações quanto à ação prolongada poder prejudicar a cicatrização de fraturas e promover a erupção dentária tardia (MARINI & SMITH, 2015; FORLINO & MARINI, 2016; MARINI et al., 2017).

Outro fármaco da classe dos antirreabsortivos é o Denosumab, cujo mecanismo de ação é similar aos bisfosfonatos, inibindo a ação dos osteoclastos para suprimir a reabsorção óssea. Entretanto, este fármaco possui meia-vida curta, de aproximadamente 30 dias, e possui efeitos colaterais fortes, especialmente em crianças, como o efeito rebote no aumento do *turnover* ósseo, hipercalcemia, osteonecrose do maxilar e fraturas atípicas no quadril, quando o tratamento é descontinuado (ROSSI et al., 2019).

A Tabela 2, a seguir, resume as principais características dos tratamentos antirreabsortivos utilizando bisfosfonatos ou Denosumab.

Tabela 2 – Principais características das terapias antirreabsortivas para a osteogênese imperfeita

TERAPIAS ANTIRREABSORATIVAS	
BISFOSFONATOS	DENOSUMAB
Atuam na inibição dos osteoclastos e <i>turnover</i> ósseo;	Atua na inibição dos osteoclastos e <i>turnover</i> ósseo;
Aumentam a DMO, melhoram a microarquitetura óssea e reduzem a taxa de fraturas;	Aumenta a DMO e reduz a taxa de fraturas; Em modelo animal promove a formação óssea do perióstio sob tratamento a longo prazo;
Aplicação oral ou intravenosa;	Aplicação subcutânea;
Meia-vida alta e acumulativa;	Meia-vida curta (aproximadamente 30 dias);
Efeitos colaterais: irritação gastrointestinal (via oral), hiperpirexia, mialgia e fraqueza (via intravenosa); A longo prazo, podem conduzir a inibição da formação óssea, prejudicar a cicatrização e promover a erupção dentária tardia;	Efeitos colaterais, especialmente em crianças: induz efeito rebote no aumento do <i>turnover</i> ósseo e hipercalcemia, quando o tratamento é descontinuado; efeitos raros incluem osteonecrose mandibular e atípicas fraturas do quadril;
São atualmente a base da terapia farmacológica para a OI, porém são menos responsivos do que no tratamento da osteoporose.	Utilizado especialmente em pacientes que respondem fracamente aos bisfosfonatos, por exemplo, OI tipo VI.

Fonte: Elaborado a partir de MARINI et al., 2017 e ROSSI et al., 2019.

Já os tratamentos anabólicos, atualmente são aprovados apenas em adultos com osteoporose e a experiência com a OI é bastante limitada. São tratamentos direcionados ao aumento da atividade dos osteoblastos e formação óssea (ROSSI et al., 2019). Os principais fármacos utilizados são: Teriparatida – forma recombinante do hormônio da paratireoide; Abaloparatida – análogo recombinante do hormônio da paratireoide; e Romosozumab – anticorpo inibidor de esclerostina (ROSSI et al., 2019). Este último possui ação sobre a esclerostina, proteína que inibe a via canônica de sinalização *Wnt* em osteoblastos, importante via para formação óssea, com estudos pré-clínicos em modelos animais para OI bastante promissores (CARDINAL et al., 2019).

Embora a meta dos tratamentos atuais para a OI seja diminuir a incidência de fraturas e de dor, promover o crescimento, aumentar a mobilidade e a independência funcional, estas abordagens não atuam na matriz desorganizada do colágeno tipo I, que se configura como principal causa da fragilidade óssea na doença. Além disso, não são eficientes em todas as classificações clínicas e podem

trazer efeitos colaterais bastante desconfortáveis aos pacientes. (MARINI et al., 2017; ROSSI et al., 2019).

3.5 Tratamento da OI no Brasil

No Brasil, em 2001 foi criada a Portaria GM 2305/2001, responsável pela criação de Centros de Referência em Osteogênese Imperfeita (CROI) e estabelecimento do primeiro protocolo de indicação de tratamento clínico da doença no país, indicando o Pamidronato dissódico como fármaco a ser utilizado, assim como sua dose e as medicações complementares. Além disso, esta mesma portaria instituiu o tratamento da OI como responsabilidade do Sistema Único de Saúde (SUS) (OGAWA, 2013; LIMA & HOROVITZ, 2014). Desde então, novas portarias foram instituídas com atualizações quanto às medidas terapêuticas a serem empregadas, assim como melhorias no diagnóstico, e nos parâmetros para avaliação da resposta terapêutica e a qualificação dos profissionais que compõem os Centros de Referência em tratamento da OI pelo país (LIMA & HOROVITZ, 2014).

Atualmente, a Portaria SAS/MS nº 1.306, de 22 de novembro de 2013, prevalece como a última atualização do protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para o tratamento da OI, quanto à administração de fármacos (Pamidronato dissódico e Alendronato), e às abordagens cirúrgicas e fisioterápicas, variando de acordo com a expressão clínica da doença e critérios fisiológicos e físicos (BRASIL, 2013). Além disso, segundo dados divulgados pela Associação Nacional de Osteogênese Imperfeita (ANOI), atualmente há cerca de 16 Centros de Referência em Osteogênese Imperfeita pelo país (ANOI, 2020), vinculados ao SUS e equipados com profissionais para o atendimento aos pacientes.

Entretanto, segundo dados disponibilizados pela Associação Brasileira de Osteogênese Imperfeita (ABOI), estimou-se que em 2013 haviam cerca de 19.075 indivíduos com OI no país, e apenas 788 deles em tratamento, sendo a maioria da região sudeste do país (438 pessoas) (OGAWA, 2013). Desta forma, o aperfeiçoamento do cadastro dos indivíduos com OI no país, assim como a disponibilidade do tratamento devem ser mais bem divulgadas pelo Ministério da Saúde para que todos sejam beneficiados. Assim como a continuidade deste

tratamento deve ser melhor definida, uma vez que o mesmo estende-se por aproximadamente dois anos, e os pacientes só retornam caso apareçam novas fraturas (BRASIL, 2013). Contudo, deve-se lembrar que há outras características clínicas da OI que vão além de fraturas.

3.6 Utilização do hormônio de crescimento para tratamento da OI

Outra abordagem farmacológica que vem sendo utilizada para tratamento da OI é a administração do hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH). O hormônio de crescimento (GH), também conhecido como hormônio somatotrópico ou somatotropina, é um hormônio hipofisário, produzido e secretado pelas células somatotrópicas da glândula hipofisária anterior, cuja proteína possui 191 aminoácidos e peso molecular de 22 kDa (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019). Sua principal função é promover o crescimento linear de quase todos os tecidos do corpo, além de promover a regulação metabólica da glicose e lipídeos, a multiplicação celular e a diferenciação específica de alguns tipos celulares, tais como as células de crescimento ósseo e células musculares. Esta ação pode ocorrer tanto diretamente por meio de seu próprio receptor, quanto indiretamente por meio da produção induzida do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019).

Sua secreção acontece em resposta à estimulação das células somatotrópicas pelo hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), secretado pelo hipotálamo. O GH atua principalmente no fígado e em tecidos-alvo estimulando a produção local (cerca de 75%) e sistêmica do IGF-I (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019). O IGF-I, também conhecido como somatomedina C, é um dos principais peptídeos produzidos pela ação do GH, possuindo 70 aminoácidos e peso molecular em torno de 7,5 kDa (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019).

O GH possui efeitos múltiplos sobre o crescimento ósseo, promovendo o aumento da reprodução de células osteogênicas e condrocíticas, e consequentemente aumentando a deposição de proteínas por estas células, como o colágeno tipo I, que promovem o crescimento ósseo. Além de promover a conversão de condrócitos em células osteogênicas, causando, assim, a deposição

de osso novo, o GH também age como forte estimulador dos osteoblastos (GUYTON & HALL, 2011).

Embora a OI não esteja relacionada à deficiência de GH, MARINI e colaboradores reportaram em 1993 anormalidades no eixo GH-somatomedina em pacientes com OI, e obtiveram um aumento no crescimento linear nesses pacientes após tratamento com hGH. Além disso, este hormônio apresenta efeito anabólico podendo promover benefícios pelo aumento da DMO e aumento da velocidade do crescimento linear em pacientes com defeito quantitativo no colágeno tipo I, podendo ser administrado sozinho ou em combinação com outros fármacos, como os bisfosfonatos (ANTONIAZZI et al., 1996; 2010).

Outros autores também mostraram a resposta positiva do GH sobre a fragilidade óssea causada pela OI, em modelo animal. KING e colaboradores (2005) realizaram um bioensaio com camundongos heterozigotos *oim*, administrando seis injeções subcutâneas de r-hGH por semana, durante nove semanas. Foram obtidos aumentos da DMO e do conteúdo mineral ósseo (CMO), melhorando assim, a qualidade óssea destes animais. Além disso, em outro bioensaio já havia sido evidenciado que o IGF-I possui a ação de aumentar o número de osteoblastos, e consequentemente aumentar a formação de osso cortical e trabecular em ratos (SPENCER et al., 1991). Desta forma, o GH e o IGF-I se apresentam como potenciais opções para tratamento anabólico da OI.

Embora a administração do r-hGH promova melhoras significativas no fenótipo para a OI, como aumento da DMO e diminuição da fragilidade óssea, em resposta ao crescimento linear, esta é ainda uma abordagem que apresenta algumas limitações e desvantagens. Assim como a administração do Pamidronato, aplicações de r-hGH são oferecidas em injeções diárias, podendo perdurar por muitos anos, o que pode gerar grande desconforto aos pacientes (BRASIL, 2010). Além disso, embora o tratamento de r-hGH esteja disponível pelo SUS de acordo com as diretrizes da Portaria SAS/MS nº 110 de 2010, o preço total do tratamento pode variar em torno de 10 mil dólares por centímetro de incremento do paciente (HOWARD & BUTLER, 2013). Este fato decorre também dos altos custos gerados pelos processos de purificação e de controle de qualidade da proteína recombinante que são indispensáveis para estabelecimento desta terapia (CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016).

Desta forma, é fundamental o desenvolvimento de uma abordagem que ofereça melhoras no fenótipo da OI, de forma a garantir maior facilidade na aplicação, produção, custo e segurança, assim como promover maior conforto para o paciente, como pela utilização da terapia gênica e da terapia celular.

3.7 Terapia gênica

Com os avanços de técnicas de manipulação e edição do genoma, o campo da terapia gênica vem crescendo e se tornando, cada vez mais, específico. Hoje pode-se manipular precisamente o genoma previamente conhecido de diversas espécies e alcançar efeitos terapêuticos, principalmente para tratamento de desordens genéticas hereditárias (MAEDER & GERSBACH, 2016), tornando-se desta forma, uma abordagem bastante estudada por diversos pesquisadores.

A terapia gênica consiste em metodologias laboratoriais de manipulação gênica, por meio de técnicas de Biologia Molecular, baseadas na tecnologia do DNA recombinante, com a capacidade de melhoramento genético por meio da introdução e expressão de genes terapêuticos, em um organismo, visando substituir, manipular ou suplementar genes ausentes, inativos ou disfuncionais para tratamento de diversas doenças (LINDEN, 2010). De forma geral, pode ser realizada *in vivo* ou *ex vivo* (Figura 5), utilizando vetores virais (adenovírus) ou não virais (plasmídeos) para facilitar a entrada do gene terapêutico nas células somáticas. Uma vez que o gene de interesse é inserido na célula, a nova informação genética utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para expressar estes produtos gênicos (LINDEN, 2010; CECCHI, 2013).

Figura 5 – Representação esquemática das técnicas *ex vivo* e *in vivo* da terapia gênica. A técnica *in vivo* consiste na introdução do DNA por meio de vetores de expressão através de injeções diretamente no indivíduo. Enquanto a técnica *ex vivo* consiste na retirada de células do paciente, que sofrerão modificações genéticas, por meio de edição gênica e, após cultura, serão readministradas no paciente.

Fonte: Autor da dissertação.

Atualmente muitos protocolos de ensaios clínicos de terapia gênica vêm sendo desenvolvidos para tratamentos de desordens, como doenças monogênicas, AIDS, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares. Em 2018, foi divulgado um panorama de ensaios clínicos de terapia gênica que foram concluídos, estavam em andamento ou foram aprovados até novembro de 2017. Foram conduzidos 2.600 ensaios em todo o mundo, com destaque para países da América e Europa, representando, respectivamente, 64,9% e 23,2% de todos os *trials* (GINN et al., 2018).

CHAMBERLAIN e colaboradores (2004 e 2008) associaram as terapias gênicas *ex vivo* e celular com células-tronco mesenquimais (CTMs), a fim de proporcionar uma melhora mais significativa aos pacientes com mutações dominantes para a OI. Estes autores construíram vetores adeno-associados (AAVs) para interromper a transcrição dos genes COL1A1 (CHAMBERLAIN et al., 2004) e COL1A2 (CHAMBERLAIN et al., 2008) mutantes dominantes, em CTMs extraídas de indivíduos com OI. Foi demonstrado assim, que ambos os genes

mutantes poderiam ser silenciados com sucesso, além de mostrar o potencial terapêutico das CTMs.

No entanto, essas metodologias exigiam uma significativa expansão celular com alta capacidade proliferativa, e as CTMs modificadas apresentavam altas taxas de senescência, resultando em um número insuficiente de células fornecidas para transplante e enxerto em escala clínica. Além disso, havia uma preocupação quanto ao destino *in vivo* dos vetores utilizados no silenciamento dos genes defeituosos (CHAMBERLAIN et al., 2004; 2008).

A luz disso, DEYLE e colaboradores (2011) desenvolveram uma estratégia alternativa, baseada também no direcionamento de genes usando AAVs em CTMs isoladas de pacientes com OI. No entanto, esta abordagem consistia em usar um vetor de direcionamento de gene AAVs para inativar os genes do colágeno mutado em CTMs, em seguida, derivar essas células em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs – *induced Pluripotent Stem Cells*), com um vetor de reprogramação policistrônico *floxed* para excluir, com a *recombinase Cre*, todos os transgenes relacionados aos vetores que foram codificados. Em seguida, as iPSCs foram diferenciadas novamente em células-tronco mesenquimais induzidas (iMSCs – *induced Mesenchymal Stem Cells*) e em cepas osteogênicas *in vitro*. Ao contrário das CTMs direcionadas a genes usadas anteriormente por CHAMBERLAIN e colaboradores (2004 e 2008), as iMSCs eram menos senescentes e tinham uma maior capacidade proliferativa remanescente, sugerindo que esta linhagem derivada de iPSCs poderá se tornar clinicamente mais útil do que as CTMs (DEYLE et al., 2011). Entretanto, o campo das iPSCs ainda é bastante recente, e embora esta abordagem represente um futuro promissor para terapias de doenças monogênicas, como a citada, mais ensaios pré-clínicos e clínicos se fazem necessários para demonstrar a segurança e eficácia desta estratégia.

Rápidos progressos têm sido feitos para enfrentar os desafios e os paradigmas representados pela terapia gênica convencional. Mesmo com o desenvolvimento de novas tecnologias para modificação precisa do genoma humano, questões de segurança e entrega ainda são persistentes. Uma dessas questões envolve a falta de literatura sobre a resposta imunológica diante às células geneticamente modificadas ou sobre a utilização *in vivo* de ferramentas de edição do genoma (MAEDER & GERSBACH, 2016). Entretanto, a terapia gênica, com apenas 50 anos, é uma realidade palpável e que está avançando em um ritmo

rápido, podendo se tornar a médio prazo uma terapia bem estabelecida (GINN et al., 2018).

3.8 Experiência do grupo de terapia gênica no CEBIO

A terapia gênica *in vivo* vem sendo utilizada no tratamento da deficiência de GH em ensaios pré-clínicos utilizando modelos animais, de forma a haver a possibilidade de liberar a proteína na circulação por um período prolongado, mediante um processo mais semelhante ao natural, garantindo conforto ao indivíduo, além de eliminar os inconvenientes da administração do r-hGH já citados (CECCHI, 2013; HIGUTI, 2016).

O nosso grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia (CEBIO), no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), possui ampla experiência no campo da terapia gênica *in vivo*, utilizando vetores plasmidiais como veículo para entrega do gene de interesse no organismo (OLIVEIRA et al., 2010; HIGUTI et al., 2012; CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016; CECCHI et al., 2017; LIMA et al., 2020; JESUS, 2020; ZACARIAS, 2020).

Plasmídeos são moléculas de DNA circular extracromossomais presentes em organismos procariontes, como as bactérias, caracterizados pela capacidade de se replicar de maneira autônoma (origem de replicação bacteriana), e por se propagarem entre as bactérias através da reprodução por conjugação (MALAJOVICH, 2016).

O primeiro plasmídeo recombinante foi desenvolvido por Stanley Cohen e Herbert Boyer na década de 70, através de técnicas de DNA recombinante. Eles produziram clones contendo um fragmento de DNA de sapo, com dois marcadores de seleção: genes que conferiram resistência a dois tipos de antibióticos. A partir disto, foram possíveis a criação de bibliotecas de genes e o mapeamento de genomas, o que permitiu a clonagem da primeira proteína recombinante: o GH (MALAJOVICH, 2016).

Hoje, os plasmídeos são amplamente utilizados no campo da biotecnologia devido sua vasta aplicabilidade, como transfecção, sequenciamento, triagem de clones, digestão de restrição, clonagem e PCR (ANDREOU, 2013). Na terapia gênica, os plasmídeos apresentam muitas vantagens em relação ao uso de vetores virais, como a facilidade da sua produção e manipulação, tornando as

questões regulatórias mais simples, além de apresentar riscos desprezíveis de reações imunogênicas indesejadas ou ativação de oncogenes (VOSS, 2007). Em 2017, cerca 16,6% (442 ensaios) dos 2.600 ensaios clínicos realizados e planejados ao redor do mundo, foram desenhados utilizando vetores a partir de DNA plasmidial (GINN et al., 2018). Estes vetores estão entre os três principais utilizados mundialmente nos ensaios clínicos de terapia gênica, logo atrás da utilização de vetores de adenovírus (20,1%) e de retrovírus (17,9%) (GINN et al., 2018).

Os vetores plasmidiais construídos e utilizados por nosso grupo contém os genes do hormônio de crescimento humano (hGH) e murino (mGH), regulados pelo promotor da Ubiquitina-C (UBI) e são administrados através de injeção intramuscular, seguida de eletroporação (OLIVEIRA et al., 2010; HIGUTI et al., 2012; CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016; CECCHI et al., 2017; LIMA et al., 2020; ZACARIAS, 2020). Esta técnica de eletroporação consiste na aplicação controlada de uma diferença de potencial (ddp) sobre o tecido alvo, proporcionando a abertura de poros transientes na membrana celular, permitindo, assim, que o DNA plasmidial adentre a célula e chegue ao núcleo, onde utilizará a maquinaria celular para a síntese proteica do gene de interesse (CERVIA et al., 2018).

A partir da associação da administração do DNA plasmidial à eletroporação, foram obtidos níveis sustentáveis e prolongados do hGH e do mGH no plasma de camundongos anões (*lit/lit*) e anões imunodeficientes (*lit/scid*), em conjunto com efeitos de melhora fenotípica destes animais (OLIVEIRA et al., 2010; HIGUTI et al., 2012; CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016; CECCHI et al., 2017; LIMA et al., 2020).

Além disso, recentemente desenvolvemos um estudo utilizando esta técnica de administração *in vivo* de plasmídeo, contendo o gene do mGH, para avaliação de parâmetros de melhora do fenótipo de camundongos heterozigotos *oim*. Foram obtidos resultados bastante promissores para a continuidade dos estudos relativos a esta abordagem terapêutica utilizada no tratamento de fenótipos leves de defeitos quantitativos do colágeno tipo I. JESUS (2020) mostrou que o mGH foi capaz de melhorar as características biomecânicas e estruturais, e estimulou a proliferação celular e o remodelamento ósseo nesses animais.

Desta forma, mais estudos se fazem necessários para melhores esclarecimentos quanto aos mecanismos de ação envolvidos nesta terapia, sua

eficácia quando administrada em conjunto com outras terapias, e sua ação em outras condições da doença, como nos animais homozigotos *oim*.

3.9 Terapia celular

Outra abordagem que vem sendo bastante estudada para a melhora do fenótipo da OI é a terapia celular, baseada no transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs). Em 2018, ROBB e colaboradores publicaram um panorama dos ensaios clínicos realizados com as CTMs como abordagem terapêutica para doenças específicas, como Doença de Crohn, isquemias e doenças agudas relacionadas ao enxertamento contra hospedeiro em transplantes, revelando 588 *trials* até agosto do mesmo ano. Destes 588, 44,05% eram terapias alogênicas, 40,99% autólogas e 0,85% com ambas as opções, evidenciando, assim, a importância que a terapia celular vem ganhando frente ao desenvolvimento de novos testes clínicos.

As CTMs são candidatas promissoras para a terapia celular de muitas doenças ósseas e cartilaginosas, como osteoartrite, artrite reumática, osteoporose, osteonecrose da cabeça do fêmur, além da osteogênese imperfeita. Muitos ensaios pré-clínicos e clínicos em modelos animais e humanos têm demonstrado a viabilidade dessas células nestes tipos de tratamentos (LIU et al., 2012; SAEED et al., 2016; ROHBAN & PIEBER, 2017).

As células-tronco mesenquimais foram descobertas na medula óssea, pela primeira vez, por FRIEDENSTEIN e colaboradores em 1970. Eles encontraram a população não-hematopoiética de células-tronco na medula óssea de fêmures de porquinhos-da-Índia, e observaram que elas eram aderentes, possuíam o formato de fuso e eram hábeis para formar colônias derivadas de uma única colônia. Desde então, os estudos e possíveis aplicações deste tipo celular vêm se tornando cada vez maiores.

Em 2006, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (ISCT) definiu os critérios mínimos para caracterizar as CTMs (DOMICINI et al., 2006). Segundo este Comitê, as CTMs devem ser aderentes ao plástico, quando mantidas em condições de cultura normal; devem expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD 90, e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-

DR; e devem se diferenciar em pelo menos três linhagens, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro*, quando submetidas a meios de diferenciação específicos (DOMICINI et al., 2006). Em camundongos, essas células devem expressar os marcadores Sca-1, CD29, CD44 e CD105 (BOXALL & JONES, 2012). Na Figura 6, a seguir, estão ilustradas as principais características das CTMs.

Podem ser isoladas e purificadas não apenas da medula óssea, mas também do cordão umbilical, do tecido adiposo branco, da placenta e da membrana amniótica da placenta (ROHBAN & PIEBER, 2017). Além disso, estas células apresentam baixa imunogenicidade por não expressarem as moléculas MHC II (*Major Histocompatibility Complex II*), permitindo a realização de transplante alogênico (ENGLISH, 2013).

Figura 6 – Representação esquemática das principais características das células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são caracterizadas por sua capacidade de auto-renovação, diferenciação em múltiplas linhagens celulares e por expressarem marcadores de superfície específicos tanto em humanos, quanto em camundongos.

Fonte: Modificado de HU et al., 2018.

Devido as suas características e sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação em osteoblastos e adipócitos, cujas funções são imprescindíveis para a manutenção da estabilidade normal do osso (HU et al., 2018; GÖTHERSTRÖM & WALTHER-JALLOW, 2020), essas células se tornaram candidatas promissoras para tratamento de doenças ósseas, como a OI.

PEREIRA e colaboradores (1998) infundiram sistemicamente CTMs e células provenientes de todo conteúdo da medula óssea (WMCs – *Whole Marrow Cells*) de camundongos *wild type* em camundongos transgênicos (*human mini-COL1A1*) com fenótipo de OI, e avaliaram o teor de colágeno através da dosagem de hidroxiprolina e o teor mineral do osso por pesagem, após um mês da infusão das células. Os resultados mostraram que o tratamento com CTMs resultou em um aumento significativo nos conteúdos mineral e de colágeno no osso, enquanto o tratamento com WMCs resultou apenas em um aumento significativo no teor de colágeno.

Em 1999, HORWITZ e colaboradores realizaram o primeiro ensaio clínico utilizando células da medula óssea (BMT – *Bone Marrow Transplantation*) para tratar OI tipo III (severa, deformante). Realizaram um transplante alogênico (HLA - idêntico ou com incompatibilidade de um único antígeno HLA-A, -B ou -DR), através da infusão intravenosa em três crianças com OI tipo III. Nos três primeiros meses, a análise histológica da crista ilíaca de um dos pacientes exibiu nova formação óssea, e após seis meses de acompanhamento, as crianças apresentaram aumento da taxa de crescimento e do conteúdo mineral ósseo. Em trabalho subsequente, HORWITZ e colaboradores (2001) repetiram a mesma estratégia de transplante alogênico de BMT pela infusão intravenosa em três crianças com OI tipo III. Após seis meses de acompanhamento, as crianças exibiram altas taxas de velocidade de crescimento, crescimento absoluto e aumento do conteúdo mineral ósseo (cerca de 25-60%), em relação ao grupo controle. Além disso, houve redução significativa do número de fraturas, em média de 10 para duas, por paciente.

Em 2002, HORWITZ e colaboradores isolaram as CTMs da medula óssea e administraram, via intravenosa, em seis crianças com OI tipo III. Após seis meses de acompanhamento, verificou-se que houve aumento da velocidade de crescimento (variação de 60-94%), porém não houve aumento significativo do conteúdo mineral ósseo.

LI, F. e cols. (2010) a fim de entenderem se CTMs contribuem para a melhora do fenótipo da OI, infundiram estas células marcadas com GFP (*Green Fluorescent Protein*), provenientes de camundongos *wild type*, com e sem suplementação de colágeno, nos côndilos femorais de camundongos *oim* heterozigotos. Após seis semanas, verificaram que as CTMs induziram a formação óssea, e que a suplementação com colágeno aumentou a deposição óssea e melhorou as propriedades biomecânicas do osso.

OTSURU e cols. (2012) transplantaram CTMs e células não aderentes (NABMCs – *Nonadherent Bone Marrow Cells*) intradermicamente em camundongos *oim* homozigotos. Após imunomarcacão dos fêmures com um anticorpo policlonal pro colágeno $\alpha 2$, verificaram que os camundongos que receberam as NABMCs apresentaram nova formação óssea e que as células se diferenciaram em osteoblastos, enquanto as CTMs secretaram um fator solúvel que estimulou indiretamente a atividade de condrócitos, promovendo o crescimento linear dos camundongos.

Por fim, RANZONI e colaboradores (2016) isolaram CTMs do líquido amniótico humano e administraram, por injeção intraperitoneal, em camundongos *oim* heterozigotos, logo após o nascimento. Foi verificado que houve diminuição do número de fraturas, aumento da dureza dos ossos e maior qualidade estrutural.

Embora esteja claro que a infusão de CTMs para o tratamento de OI seja viável, ainda não se sabe quais são os mecanismos de ação destas células na reparação óssea. O que se tem hoje na literatura é que essas células secretam fatores que modulam os microambientes para o reparo tecidual e, portanto, acredita-se que elas promovam uma ação parácrina, recrutando ou induzindo diferenciação endógena para iniciar o processo de reparação, proliferação celular e, posteriormente, sofram uma diferenciação gradual e participem da formação óssea (LI, F. et al., 2010; OTSURU et al., 2012; RANZONI et al., 2016; HU et al., 2018; GÖTHERSTRÖM & WALTHER-JALLOW, 2020).

Além disso, não há evidências na literatura, até o presente momento, sobre a utilização de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo para tratamento da OI. O tecido adiposo é uma das fontes alternativas mais promissoras para obtenção das CTMs, pois estas células podem ser obtidas através de métodos menos invasivos e em maior quantidade do que as CTMs da medula óssea, apresentando alta capacidade de renovação e diferenciação

osteogênica (KERN et al., 2006; MAZINI et al., 2019). Ademais, estas células vêm sendo amplamente utilizadas em ensaios pré-clínicos com humanos e animais para tratamento de osteoporose, apresentando resultados positivos quanto à melhora da qualidade óssea trabecular, aumento da DMO e formação óssea (HU et al., 2018).

Desta forma, acreditamos que a utilização da terapia celular combinada à terapia gênica para tratamento da OI sejam técnicas promissoras para futuros ensaios pré-clínicos da doença. Assim, buscamos a partir da eletrotransferência plasmidial do gene do mGH acompanhada da infusão de células mesenquimais em camundongos *oim*, a melhora fenotípica destes animais. Além disso, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a combinação da terapia gênica *in vivo* com a terapia celular, como abordagem terapêutica para esta doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Centro de Biotecnologia e do Biotério do IPEN/CNEN-SP, os quais possuem o Certificado de Qualidade em Biossegurança de número CQB 0067/98, e a infraestrutura adequada para o desenvolvimento do mesmo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IPEN), obtendo o certificado nº 206/18 em 18 de janeiro de 2018.

A extração e caracterização das células-tronco mesenquimais foram realizadas nos laboratórios e no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein, mediante colaboração com o grupo da Dra. Érika Bevilaqua Rangel.

Os ensaios foram organizados conforme o fluxograma apresentado:

Genotipagem	<ul style="list-style-type: none"> Utilização das técnicas de extração de DNA genômico e PCR
Obtenção do DNA plasmidial	<ul style="list-style-type: none"> Utilização das técnicas de transformação, seleção, amplificação e extração de DNA plasmidial
Eletrotransferência do DNA	<ul style="list-style-type: none"> Eletroporação do DNA plasmidial nos músculos tibiais anteriores dos camundongos <i>oim</i> heterozigotos
Obtenção das células-tronco mesenquimais	<ul style="list-style-type: none"> Extração das células por meio de técnicas de lavagem da medula e digestão enzimática do tecido adiposo
Caracterização das células-troncos	<ul style="list-style-type: none"> Avaliação da imunofenotipagem e da capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica
Irradiação dos camundongos	<ul style="list-style-type: none"> Irradiação de corpo inteiro realizada numa fonte panorâmica de radiação gama contendo Co⁶⁰
Transplante celular	<ul style="list-style-type: none"> Aplicação das células através dos côndilos femorais dos camundongos <i>oim</i>
Avaliação de crescimento	<ul style="list-style-type: none"> Análise de peso, comprimento do corpo e da cauda, e comprimento dos fêmures
Densitometria óssea	<ul style="list-style-type: none"> Realizada a partir da radiografia dos fêmures
Teste biomecânico	<ul style="list-style-type: none"> Aplicação de carga sobre os fêmures e avaliação dos parâmetros de flexibilidade e resistência
Dosagens de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> Quantificação por ELISA das cadeias COL1A1 e COL1A2, e dos hormônios mGH e mIGF-I

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos portadores de osteogênese imperfeita (*oim*) heterozigotos (*oim/wt*), obtidos após cruzamento de camundongos homozigotos (*oim/oim*) B6C3Fe a/a-Col1a2^{*oim*}/J, provenientes do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA), com camundongos C57BL/6J, obtidos no Biotério do IPEN. Além disso, também foram realizados cruzamentos entre heterozigotos (*oim/wt*) para obtenção, após genotipagem, de linhagens homozigotas para manter a matriz. Camundongos sem mutação (C57BL/6J) e camundongos heterozigotos *oim* não tratados, de idades similares, foram utilizados, respectivamente, como controles positivo e negativo dos parâmetros avaliados.

Todos os animais utilizados foram mantidos em estantes climatizadas em área controlada do nosso Biotério, e as práticas realizadas seguiram-se conforme as normas de biossegurança e do uso de animais de laboratório propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovadas pelo CEUA do IPEN sob o registro nº 206/18 de 18 de janeiro de 2018.

4.2 Genotipagem dos camundongos *oim*

A genotipagem dos camundongos *oim* foi realizada para confirmar a presença da mutação que confere a osteogênese imperfeita. Foram coletadas amostras de tecido da orelha dos animais e o DNA foi extraído utilizando o sistema *REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR* da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA), seguindo instruções do fabricante. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada conforme protocolo de SABAN e KING (1996), utilizando-se *primers* específicos sintetizados pela empresa *Exxtend* (Paulínea, São Paulo, BR): F35-*wt* e B22-*wt* para gerar um produto de PCR de 157/158-pb de ambos os alelos (controle da reação) e B21-*wt* ou B21-*oim* para diferenciar o alelo mutado do selvagem, gerando um produto de PCR de 119 ou 120 pb, respectivamente.

Para cada amostra de DNA foram realizadas duas reações de PCR, contendo quantidades padronizadas do *REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix* da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA) e três *primers* em cada reação. Ambas as

reações receberam os primers F35-wt e B22-wt (*forward* e *backward*, respectivamente) e para diferenciação dos alelos, uma das reações recebeu o *primer backward* B21-wt que se anela à sequência selvagem, enquanto a outra reação recebeu *primer backward* B21-oim, que se anela à sequência mutada do DNA genômico. Na Figura 7 está ilustrada a preparação das duas reações de PCR para uma mesma amostra de DNA e as etapas do método.

As sequências dos *primers* utilizados foram:

F35-wt: 5'-GGCTTTCCTAGACCCCGATGCTTAG-3' Tm = 63,6 °C;

B21-oim: 5'-GTCTTGCCCCATTCATTTGTT-3' Tm = 55,1 °C;

B21-wt: 5'-GTCTTGCCCCATTCATTTGTC-3' Tm = 56,1 °C;

B22-wt: 5'-GCAGGCGAGATGGCTTATTTG-3' Tm = 58,6 °C.

As condições da PCR foram: 35 ciclos; desnaturação a 94 °C (60 s); anelamento a 58 °C (30 s); extensão a 72 °C (30 s).

Figura 7 – Representação esquemática da preparação das duas reações de PCR a partir da mesma amostra de DNA e as etapas do método. 7A. Para cada reação de PCR são adicionados ao tubo de 0,2 mL quantidades padronizadas de DNA extraído a partir de tecido, mix para PCR e *primers*. As reações diferem apenas na adição de *primers* específicos B21-oim (Reação 1) e B21-wt (Reação 2). 7B. Etapas da PCR: desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão da fita.

Fonte: Autor da dissertação

Após a amplificação do DNA, as amostras foram analisadas em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo ou utilizando-se o corante fluorescente *Blue Green Loading Dye I* da LGC Biotecnologia (Cotia, São Paulo, BR). Foi utilizado um marcador de massa molecular de 100 pb (*Ludwig Biotecnologia*, Alvorada, Rio Grande do Sul, BR) e o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 80 V durante 1 h e 30 min, seguido de visualização em luz ultravioleta.

Uma vez confirmados os genótipos dos animais, camundongos machos e fêmeas homozigotos (*oim/oim*) foram selecionados para cruzamento com animais normais (C57BL/6J) e estabelecimento de linhagens heterozigotas da doença. Na Figura 8 é apresentado um heredograma esquematizando os cruzamentos até obtenção da linhagem heterozigota.

Figura 8 – Heredograma esquematizando os cruzamentos entre camundongos normais e *oim* até a obtenção da linhagem heterozigota, selecionada para a experimentação.

Fonte: JESUS, 2020.

4.3 Plasmídeo

O plasmídeo utilizado neste trabalho, o pUC-UBI-mGH (Figura 9), foi construído por nosso grupo (CECCHI et al., 2014), a partir do cassete de expressão do pUBI-UBI-hGH, com a retirada do gene do hGH para inserção da sequência genômica do GH de camundongo (mGH-gDNA) de 1,6 kb.

Figura 9 – Mapa do pUC-UBI-mGH de 5830 pb, contendo a sequência do DNA genômico mGH de 1,6 kb entre os sítios de restrição BamHI e EcoRI, o promotor da Ubiquitina-C humana e o gene de resistência à ampicilina.

Fonte: CECCHI et al., 2014.

O pUC-UBI-mGH foi transformado em bactérias *E. coli* DH5α competentes quimicamente, e as colônias contendo o plasmídeo foram selecionadas em placa contendo ampicilina. Em seguida, houve a amplificação das colônias selecionadas em meio Luria Bertani (LB), também com ampicilina. A purificação do plasmídeo foi realizada utilizando o *kit* de DNA *Xtra Midi/Maxi-Nucleobond Machnerey-Nagel* (Duren, Alemanha). A quantificação do plasmídeo purificado foi realizada por leitura espectrométrica em *Nanodrop* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA) e a presença do inserto correspondente à sequência genômica do mGH confirmada por análise de restrição, utilizando as enzimas BamHI e EcoRI, ambas da *Invitrogen* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA).

4.4 Eletrotransferência

A eletroporação é uma técnica de entrega de diversos tipos de moléculas, como DNA, RNA e proteínas, *in vivo* e *in vitro*, sem a necessidade de veículos virais ou produtos químicos. Diante disso, e em comparação com outros métodos de entrega de genes, é considerada uma técnica relativamente barata, flexível e segura em aplicações clínicas (CERVIA et al., 2018). Sua metodologia baseia-se na aplicação controlada de um campo elétrico sobre o tecido alvo, proporcionando a abertura de poros transientes na membrana celular, permitindo,

assim, que a molécula de interesse possa adentrar a célula (Figura 10) (CERVIA et al., 2018).

Figura 10 – Representação esquemática do processo de eletroporação. É aplicada uma corrente elétrica sobre o tecido alvo que promove a abertura de poros transitórios na membrana celular, proporcionando a passagem de moléculas, como os plasmídeos.

Fonte: Autor da dissertação.

Um protocolo de eletroporação foi otimizado recentemente por nosso grupo de terapia gênica (LIMA et al., 2020), a fim de melhorar a eficiência de transfecção do plasmídeo contendo o gene do mGH em músculos tibiais anteriores de camundongos anões (*lit/lit*) imunocompetentes. Portanto, a metodologia utilizada aqui para a eletroporação foi totalmente baseada neste trabalho.

Os camundongos *oim* heterozigotos foram inicialmente anestesiados com uma solução de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. Previamente à eletroporação, foi injetada nos músculos tibiais anteriores direito e esquerdo a enzima hialuronidase (20 U/20 µL) (BIOMETIL, Santa Catarina, Brasil), que facilita a entrada do DNA plasmidial nas fibras musculares, por catalisar a hidrólise do

ácido hialurônico presente na matriz extracelular (FAVRE et al., 2000). Após 30 minutos, foram administradas duas injeções do plasmídeo pUC-UBI-mGH (50 µg/20 µL) em cada músculo tibial, seguidas por três pulsos de voltagem intermediária (375 V/cm de 25 ms), utilizando um eletroporador ECM-830 e eletrodos do tipo paquímetro com distância de 3 mm entre as placas de 1,0 x 1,0 cm, ambos da BTX (Holliston, MA, EUA). Como controle negativo foi administrada solução salina (20 µL) em dois pontos de cada músculo tibial de camundongos *oim* heterozigotos, seguida de eletroporação. Esta metodologia foi repetida após 30 dias da primeira eletroporação.

4.5 Extração, isolamento, caracterização e cultura das células-tronco mesenquimais de camundongo

As CTMs da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) foram extraídas pelo grupo de pesquisa da Dra. Érika Bevilaqua Rangel, do Hospital Albert Einstein. Foi utilizado o camundongo Rosa26^{mt/mg} (*tomato*), proveniente do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA), uma linhagem que possui sítios *loxP* em ambos os lados de um cassete *tdTomato* (mT) direcionada à membrana e que expressa intensa fluorescência vermelha em todos os tecidos e tipos de células examinados (MUZUMDAR et al., 2007).

Todos os procedimentos citados foram realizados nos laboratórios do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) e do Hospital Israelita Albert Einstein, e os dados apresentados foram cedidos pela Dra. Érika Bevilaqua Rangel.

As CTMs da medula óssea (CTM-MO) foram obtidas através do método de lavagem da medula, utilizando-se uma agulha de calibre 30 (0,30 mm), acoplada a uma seringa de 20 mL contendo meio DMEM/F12 (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*) (Gibco® Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Fêmures e tibias foram retirados dos camundongos *tomato* e suas epífises foram cortadas para permitir a abertura da cavidade medular. Em seguida, a seringa contendo o meio DMEM/F12 foi inserida nesta abertura e o conteúdo medular lavado em um filtro de nylon de 40 µm acoplado a um tubo de centrifugação de 50 mL. As células provenientes do estroma passaram pelo filtro e ficaram depositadas no fundo do tubo juntamente com o fluído de lavagem. Após duas centrifugações a

800 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e acrescido novo meio DMEM/F12 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (*Vitrocell*, Campinas, São Paulo, BR) e 1% de penicilina e estreptomicina (*Invitrogen, Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA). Em seguida, as células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² e mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C. A metodologia empregada aqui foi recentemente publicada em periódico internacional por SÁVIO-SILVA e colaboradores (2021).

Já as CTMs do tecido adiposo (CTM-TA) foram obtidas através da digestão do tecido adiposo extraído da região abdominal dos camundongos *tomato* pela utilização da enzima collagenase tipo II, durante 30 minutos em agitação. As células obtidas além de pequenos fragmentos de tecido não digeridos foram plaqueados em garrafa de cultura de 25 cm² com meio DMEM/F12 suplementado com 20% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina, e mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C.

Após cultura primária, estas células foram caracterizadas, primeiramente por seu fenótipo de fuso, capacidade de aderência ao plástico e pela presença de marcadores de anticorpos de superfície específicos de células-tronco, quantificados por citometria de fluxo (*BD LSRFortessa*, Viena, Austria), seguindo os propostos descritos por DOMICINI e colaboradores em 2006. Referente à expressão dos epítomos das CTM-TA, foram utilizados os marcadores anti-camundongo CD 29, CD 31, CD 34, CD 44, CD 45, CD 90, CD 105 e SCA-1 (*stem cell antigen-1*), enquanto para a expressão dos epítomos das CTM-MO foram utilizados os anticorpos monoclonais CD34, CD29, CD44, CD105, CD90 e CD45. Todos os anticorpos utilizados foram conjugados com o fluoróforo FITC (*Invitrogen, Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA), exceto o CD 105, para a imunofenotipagem.

Além disso, foram realizados ensaios de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*, através da sua indução por reagentes específicos em meio de cultura e, em seguida, coloração pelos marcadores *Oil red O* – depósito de lipídeos e *Alizarin red S* – cristais de cálcio, seguindo a metodologia proposta por RANGEL e colaboradores, 2013. Para a indução da diferenciação adipogênica, as células foram plaqueadas em meio de cultura com 10% de SFB contendo 1 µM dexametasona, 0,5 µM 1-metil-3-isobutilxantina, 10 µg/mL insulina, e 100 µM indometacina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), por 2 semanas. E para a diferenciação osteogênica, as células foram plaqueadas em meio de cultura com

10% SFB contendo 1 μ M dexametasona, 0,2 mM ácido ascórbico e 10 mM β -glicerol-fosfato (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), por 4 semanas.

Uma vez caracterizadas as linhagens de CTMs, estas células foram cedidas gentilmente pelo grupo de pesquisa da Dra. Érika, em passagens inferiores a 10, e expandidas em nosso laboratório de cultura celular, no Centro de Biotecnologia do IPEN, sob as mesmas condições iniciais. As CTMs foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 20% de SFB e 1% de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (*Vitrocell*), mantidas em estufa de CO₂ a 5% e 37 °C. Quando atingiram a confluência de 80%-90%, as células foram submetidas à subcultura utilizando tripsina-EDTA a 0,25% (1x) (*Gibco*® *Life Technologies*) e replaqueadas ou congeladas em SFB a 90% e dimetilsufóxido (DMSO) a 10%. As células utilizadas para o transplante estavam em passagem 10 e viabilidade média de 98%.

Para visualização da fluorescência em microscópio (*Nikon Eclipse TS100-F*), as células foram excitadas em um comprimento de onda de, aproximadamente, 550 nm (luz verde) e foram captadas na emissão de 700 nm (luz vermelha).

4.6 Irradiação dos animais para aplicação das CTMs

Os camundongos heterozigotos *oim* foram submetidos ao procedimento de irradiação de corpo inteiro, a fim de proporcionar melhor enxertamento das células (FRANÇOIS et al., 2006; HERBERG et al., 2014), além de prevenir a resposta imune das células hospedeiras contra o enxerto das novas células (PONOMARYOV, et al., 2000; KAWAGUCHI et al., 2019). A metodologia a seguir foi adaptada de VIEIRA (2007). Os animais foram acomodados, sem a utilização de anestésicos, em tubos de PVC (cloreto de polivinila) com comprimento de 10 cm e diâmetro de 3,2 cm (1,26 polegadas). Cada tubo continha oito furos, de aproximadamente 8 mm, para passagem de ar e foram fechados conforme Figura 11.

Figura 11 – Irradiação dos camundongos. 11A. Camundongos dentro dos tubos de PVC, fechados e posicionados no suporte para irradiação. 11B. Animais posicionados a 20 cm da fonte panorâmica de radiação gama (Co^{60}).

Fonte: Autor da dissertação.

A irradiação ocorreu no corpo inteiro do animal, e foi realizada numa fonte panorâmica de radiação gama contendo Co^{60} (Yoshizawa Kiko Co.), localizada no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) no IPEN. A dose utilizada foi de 4 Gy (não letal), a 20 cm da fonte. A taxa de dose média e o tempo de exposição foram variáveis de acordo com a dose e a atividade da fonte, e foram registrados na Tabela 3 a seguir. Foram realizadas três irradiações ao longo deste trabalho.

Tabela 3 – Taxas de doses médias e tempos de exposição das irradiações dos camundongos *oim* realizadas no CETER.

Data da irradiação	Taxa de dose média (Gy/h)	Mês de mensuração da atividade da fonte	Tempo de exposição	Dose média por tempo (Gy/s)
22/10/2019	19,75	Outubro de 2019	12,15 min. (729 s)	0,00548
02/03/2020	18,68	Março de 2020	12,85 min. (771 s)	0,00518
22/09/2020	17,48	Setembro de 2020	13,73 min. (824 s)	0,00485

Fonte: Dados disponibilizados pela tecnologista Elizabeth Somessari do CETER.

4.7 Aplicação das CTMs nos cõndilos femorais dos camundongos *oim*

Para aplicação, as células foram descongeladas em meio DMEM/F12, e após a retirada do soro e do DMSO por centrifugação, foram ressuspensas em tampão fosfato-salina (PBS). Quatro horas após a irradiação, os animais foram anestesiados, com uma solução de xilazina e quetamina via intraperitoneal, e receberam aproximadamente 1.10^6 células, em 20 μL de PBS em cada cõndilo

femoral. Para isto, o joelho dos animais foi flexionado a 90°, e uma agulha de calibre 26 (0,45 mm), acoplada a uma seringa de 1 mL, foi inserida na superfície articular através do tendão patelar e no espaço medular, conforme ilustrado na Figura 12 (adaptado de LI, F. et al., 2010; PAULEY et al., 2014). Após a injeção de células, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de 20 µL do antiinflamatório Meloxicam (Eurofarma, São Paulo, BR) (15 mg/1,5 mL) diluído 1:10 em PBS.

A escolha pela aplicação local das CTMs foi baseada em achados da literatura que evidenciam que aplicação local *versus* intravenosa ou intraperitoneal apresenta melhor enxertamento *in vivo*, promovendo diferenciação local (PAULEY et al., 2014), o que auxilia, de forma mais eficiente, no reparo tecidual. Além disso, as CTMs tendem a ficar presas em tecidos bastante vascularizados como pulmão, baço e fígado, após a administração sistêmica (WANG et al., 2011).

Figura 12 – Local de aplicação das CTMs. O joelho dos animais foi flexionado a 90° e uma agulha de calibre 26, acoplada a uma seringa de 1 mL, foi inserida na região do côndilo femoral.

Fonte: Autor da dissertação.

4.8 Bioensaio para comparação entre as CTM-MO e CTM-TA quanto à melhora fenotípica da OI

A fim de avaliar o melhor tipo celular (proveniente da medula óssea ou do tecido adiposo), os camundongos *oim* heterozigotos, com idades entre 30 a 42 dias, *oim* (n=17) foram, inicialmente, divididos em três grupos (n=5-6 cada) (Figura 13), e três dias antes do ensaio foram submetidos à radiografia para obtenção da densitometria óssea e comprimento dos fêmures iniciais. No dia da cirurgia, os animais dos grupos experimentais (CTM-TA e CTM-MO) foram submetidos à irradiação e, quatro horas após, receberam uma injeção de, aproximadamente, 1.10^6 de células em cada cômulo femoral, sob anestesia. O primeiro grupo (controle negativo) recebeu 20 μ L de PBS em cada cômulo femoral; o segundo grupo recebeu 1.10^6 de CTM-TA em 20 μ L de PBS; e o terceiro grupo recebeu 1.10^6 CTM-MO em 20 μ L de PBS. Vinte dias após a aplicação, os animais foram submetidos à radiografia e a densidade óssea e o comprimento dos fêmures foram mensurados para avaliação preliminar dos resultados. Após 45 dias de ensaio, os animais foram submetidos novamente à radiografia para aquisição da densidade óssea e do comprimento dos fêmures finais. Além disso, seus músculos quadríceps e fêmures foram retirados para quantificação das concentrações das cadeias COL1A1 e COL1A2 e teste de flexão de três pontos, respectivamente. Durante todo o período de ensaio, acompanhamos o ganho de peso dos animais. Na Figura 14 está ilustrado o delineamento experimental deste ensaio.

Figura 13 – Organização dos grupos para o bioensaio de comparação entre as células provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA): grupo controle negativo, grupo CTM-TA e grupo CTM-MO.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 14 – Representação esquemática do delineamento experimental do bioensaio para comparação entre as CTMs do tecido adiposo e da medula óssea.

Fonte: Autor da dissertação.

Este bioensaio foi repetido, porém utilizando-se também animais C57BL/6J, como o grupo de controle positivo. Os animais utilizados no total (n=22) tinham de 40 a 70 dias de idade, e foram organizados conforme a Figura 15.

Figura 15 – Organização dos grupos do segundo bioensaio para comparação entre as células provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA): grupo controle negativo, grupo CTM-TA, grupo CTM-MO e grupo controle positivo.

Fonte: Autor da dissertação.

4.9 Bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica

Uma vez definida a melhor CTM para a melhora do fenótipo da OI, os camundongos *oim* heterozigotos (n=31) e camundongos C57BL/6J (n=5), com idades entre 35 a 76 dias, foram organizados em cinco grupos (n=5-8 cada), conforme ilustrado na Figura 16. No dia zero, os animais dos grupos experimentais 1 e 2 foram irradiados conforme descrito anteriormente, e aproximadamente quatro horas após, receberam uma injeção em cada cômulo femoral, de aproximadamente

1×10^6 células em 20 μL de PBS. Uma semana após, os grupos experimentais 2 e 3 receberam duas injeções do plasmídeo pUC-UBI-mGH (50 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação, conforme descrito previamente. O grupo controle negativo (grupo 4), recebeu no dia zero uma injeção em cada côndilo femoral contendo 20 μL de PBS e uma semana após, duas injeções de PBS (20 μL) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação. Os camundongos C57BL/6J foram utilizados como controle positivo.

Trinta dias após a primeira eletroporação, os grupos experimentais 2 e 3 receberam, novamente, duas injeções do plasmídeo pUC-UBI-mGH (50 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação. Assim como o grupo controle negativo, recebeu duas injeções de PBS (20 μL) em cada músculo tibial, seguido também de eletroporação.

Figura 16 – Organização dos grupos do bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica. 1. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados apenas com as CTMs. 2. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados com as CTMs e a eletroporação do DNA plasmidial. 3. Grupo experimental de camundongos oim heterozigotos tratados apenas com eletroporação do DNA plasmidial. 4. Grupo controle negativo de camundongos oim heterozigotos que receberam PBS. 5. Grupo controle positivo de camundongos C57BL/6J.

Fonte: Autor da dissertação.

O bioensaio teve duração de 60 dias, e foram determinados o peso corpóreo em balança digital semanalmente; medidas de comprimento (corpo, cauda) usando paquímetro digital, no início e no final do experimento. Ao final do ensaio, os animais foram eutanasiados e coletado sangue para dosagem das concentrações plasmáticas de mGH e de mIGF-I, os músculos quadríceps para quantificação das

cadeias COL1A1 e COL1A2, e os fêmures para determinação da fragilidade óssea pelo teste de flexão de três pontos (teste biomecânico). Não foi possível realizar mensurações de densidade óssea e variação do comprimento dos fêmures, devido a problemas técnicos que não foram resolvidos por causa da pandemia do coronavírus. O delineamento experimental deste bioensaio está ilustrado na Figura 17.

Figura 17 – Representação esquemática do delineamento experimental do bioensaio para avaliação pré-clínica. 60' refere-se aos 60 dias após a irradiação e transplante das CTMs, enquanto 60'' refere-se aos 60 dias após a primeira eletroporação.

Fonte: Autor da dissertação.

4.10 Medida do comprimento e da densidade óssea do fêmur

A densidade óssea e o comprimento dos fêmores foram obtidos através da técnica de raios-X de dupla energia (DEXA), utilizando o equipamento: *In vivo Imaging System FXPRO* da Bruker (Billerica, MA, EUA), disponível no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP), do Instituto de Ciências Biomédicas IV (USP/São Paulo), antes do início e do término dos experimentos. Os animais foram

anestesiados com uma solução de xilazina e quetamina, via intraperitoneal, e foram mantidos sob anestesia durante toda a aquisição das imagens.

Para a densitometria óssea, as imagens radiográficas dos animais foram geradas com um filtro a fim de oferecer maior precisão para mensurar a densidade, e foram analisadas utilizando o *software* de análise *Molecular Imaging Software*, integrado ao equipamento. A densidade dos fêmures foi adquirida a partir da média de cinco regiões de interesse (ROI) das epífises e metáfises proximais e distais dos fêmures (Figura 18A), região com população trabecular (metodologia adaptada de JESUS, 2020). Já os comprimentos dos fêmures foram obtidos da ponta da epífise proximal até a epífise distal, através do *software Image J* (*National Institute of Health*, Maryland, EUA), a partir das imagens obtidas pelo raio X (Figura 18B).

Figura 18 – Esquema das metodologias empregadas para obtenção da densidade óssea e do comprimento dos fêmures. 18A. Escolha de cinco regiões de interesse (ROIs), de mesmo comprimento, em cada fêmur, compreendendo as epífises e metáfises distais e proximais para cálculo da média da densidade óssea, obtida pelo *software* integrado ao equipado de raio-X. 18B. Obtenção do comprimento total do fêmur (epífise distal a epífise proximal) através do *software Image J*.

Fonte: Autor da dissertação.

4.11 Determinação da fragilidade óssea (teste biomecânico)

Fêmures foram submetidos ao teste de flexão de três pontos para obtenção de suas propriedades biomecânicas com a utilização de uma máquina de teste universal (modelo 3342, Instron, São Francisco, CA, EUA), localizada na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), unidade de Santos. Os parâmetros utilizados foram baseados em JESUS, 2020. Utilizamos uma célula de carga com capacidade máxima de 500 N e pré-carga de 5 N em apoios de 0,60 ou 0,80 cm, de acordo com o comprimento dos fêmures. A força de flexão foi aplicada na direção antero-posterior da parte central da diáfise dos fêmures, a uma tensão constante de velocidade de 1 mm/min, até ocorrer a fratura (Figura 19). Foram analisados os parâmetros de carga máxima suportada, extensão da flexão e o tempo até a fratura para avaliar as propriedades biomecânicas do tecido ósseo.

Figura 19 – Ilustração do teste de flexão realizado na UNIFESP, unidade Santos. 19A. Fêmur centralizado sobre o apoio de 8 mm. A força está sendo aplicada na região antero-posterior na parte central da diáfise. 19B. Momento da fratura. A força para de ser aplicada e o aparelho registra os dados.

Fonte: Autor da dissertação.

4.12 Quantificação das cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno tipo I

As concentrações das cadeias alfa 1 (COL1A1) e alfa 2 (COL1A2) do colágeno tipo I foram determinadas utilizando os sistemas comerciais *Mouse Collagen Type I Alpha 1 ELISA kit (Col1a1)* e *Mouse Collagen Type I Alpha 2 ELISA kit (Col1a2)*, ambos da *ABclonal* (Wuhan, Hubei, China). Para isto, os músculos quadríceps dos animais foram retirados logo após a eutanásia e, em seguida, submetidos à extração das proteínas utilizando o reagente *CellLytic™ MT – Mammalian Tissue Lysis/ Extraction Reagent* da *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, Missouri, EUA), seguindo orientações do fabricante. As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de placas de microtitulação (*Multiskan EX, Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm, e as concentrações dos analitos foram obtidas através do *software* integrado *Ascent software for Multiskan iEMS Reader MF*, e ajustadas pelo *software My Assays* (disponível em <<http://www.myassays.com>>). As doses mínimas de detecção para as cadeias COL1A1 e COL1A2 são de 0,57 e 0,247 ng/mL, respectivamente.

4.13 Dosagem de mGH e de mIGF-I

Os níveis de expressão *in vivo* de mGH e de mIGF-I foram determinados utilizando os sistemas comerciais *Rat/Mouse Growth Hormone ELISA* da *Millipore* (St. Charles, MO, EUA) e *Quantikine mouse/rat IGF-I immunoassay* da *R&D SYSTEM* (Minneapolis, MN, EUA), respectivamente. As leituras das absorbâncias foram realizadas em um leitor de placas de microtitulação (*Multiskan EX, Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm, e as concentrações dos analitos foram obtidas através do *software* integrado *Ascent software for Multiskan iEMS Reader MF*, e ajustadas pelo *software My Assays* (disponível em <<http://www.myassays.com>>). As doses mínimas de detecção para o mGH e mIGF-I, são de 0,07 ng/mL e 3,5 pg/mL, respectivamente.

4.14 Análise estatística

As comparações dos parâmetros de melhora do fenótipo da OI foram realizadas por meio do teste t de *Student* entre os grupos, utilizando-se controles

positivos e negativos nas análises. Foram considerados diferença não significativa $P > 0,05$. Os dados foram apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão (DP). Os múltiplos grupos foram analisados utilizando o programa estatístico *Graphpad Prism* (versão 8.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), mediante análise de variância “two way ANOVA”.

5 RESULTADOS

5.1 Genotipagem

A genotipagem dos camundongos *oim* foi realizada para confirmar a presença da mutação que confere a osteogênese imperfeita e para selecionar o macho homozigoto para acasalamento com a fêmea *wild type*, a fim de produzir uma geração heterozigota para tratamento. Amostras do tecido das orelhas dos animais foram coletadas, submetidas à extração do DNA, PCR em duas etapas para cada amostra e corrida eletroforética, conforme descrito no item Materiais e Métodos. Na primeira reação, quando utiliza-se o primer B21-*oim*, pode-se visualizar duas bandas no gel nas alturas de 157 pb (extensão do *primer* F35-*wt* até B22-*wt*) e 119 pb (extensão do *primer* F35-*wt* até B21-*oim*). A partir disto, os animais são identificados como possíveis homozigotos ou heterozigotos para Ol. Os animais normais (*wild type*) são identificados através de uma única banda visível no gel correspondente à altura de 158 pb, indicando que não houve anelamento do *primer* B21-*oim*. Na análise da segunda reação, na qual foi utilizado o *primer* B21-*wt*, quando visualizamos uma única banda na altura de 157 pb (extensão de F35-*wt* até B22-*wt*), os camundongos são confirmados como homozigotos (*oim/oim*) para Ol. Da mesma forma, os heterozigotos (*oim/wt*) são confirmados quando visualizamos duas bandas no gel, nas alturas de 157 pb e de 120 pb, esta última indicando a extensão do *primer* F35-*wt* até B21-*wt* do alelo não mutado. Enquanto os normais são confirmados através, também, das duas bandas de 157 e 120 pb. Na Tabela 4 e na Figura 20 está ilustrada a interpretação da genotipagem de acordo com o tamanho das bandas obtidas no gel de agarose e o gel propriamente dito, respectivamente.

Uma vez realizada a genotipagem, os animais homozigotos foram selecionados para acasalamento com animais normais C57BL/6J e produziram a linhagem heterozigota, utilizada nos experimentos.

Tabela 4 – Interpretação da genotipagem dos camundongos *oim*, de acordo com o tamanho das bandas das duas reações obtidas, após PCR, em gel de agarose.

PCR	Tamanho esperado das bandas (pb)	Genótipo	Fenótipo
1ª Reação	157 e 119 pb	Portador homozigoto	Osteogênese Imperfeita
2ª Reação	157 pb	(<i>oim/oim</i>)	moderada a severa
1ª Reação	157 e 119 pb	Portador heterozigoto	Osteogênese Imperfeita
2ª Reação	157 e 120 pb	(<i>oim/wt</i>)	leve
1ª Reação	158 pb	Não portador	Normal
2ª Reação	157 e 120 pb	(<i>wt/wt</i>)	

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 20 – Gel de agarose exemplificando a genotipagem de camundongos *oim*. (*Marker*) Marcador de peso molecular de 100 pb, (M1) macho 1 – homozigoto (*oim/oim*) para OI, (M2) macho 2 – heterozigoto (*oim/wt*) para OI, (M3) macho 3 – normal (*wt/wt*).

Fonte: Autor da dissertação.

5.2 Extração, caracterização e diferenciação das CTMs no CETEC e Hospital Albert Einstein

Os dados apresentados a seguir foram disponibilizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Érika Bevilaqua Rangel, e todos os experimentos realizados no CETEC e nos laboratórios do Hospital Israelita Albert Einstein.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) foram extraídas de camundongos *Rosa26^{mt/mg}* (*tomato*), e após a cultura primária, foram caracterizadas por sua forma de fuso e aderência ao plástico, além da sua capacidade de multidiferenciação e de imunofenotipagem.

Os resultados da imunofenotipagem tanto das CTM-MO (Figura 21) quanto das CTM-TA (Figura 22) mostraram que as células expressaram os marcadores de superfície atribuídos às CTMs murinas. As CTM-MO expressaram os marcadores CD 29 e CD 44, além do CD 105. Não expressaram marcadores associados a células hematopoiéticas, como o CD 34. Mas expressaram o marcador CD45. Da mesma forma, as CTM-TA expressaram fortemente os marcadores referentes às CTMs, como CD 29 e Sca-1, expressaram fracamente o CD 44, e não expressaram os outros marcadores, incluindo os CD 34 e CD 45, marcadores de células-tronco hematopoiéticas.

Figura 21 – Imunofenotipagem das CTM-MO, mostrando a expressão de marcadores de superfície atribuídos às CTMs murinas, como CD 29, CD 44 e CD 105.

Fonte: Dados não publicados e disponibilizados pela Dra. Érika Rangel.

Figura 22 – Imunofenotipagem das CTM-TA, mostrando a expressão de marcadores de superfície atribuídos às CTMs murinas, como CD 29 e Sca-1.

Fonte: Dados não publicados e disponibilizados pela Dra. Érika Rangel.

Quanto a sua capacidade de multidiferenciação, as CTMs foram induzidas *in vitro* à diferenciação adipogênica e osteogênica, através da utilização de reagentes específicos em meio de cultura e, em seguida, foram coradas pelos marcadores *oil red O*, que cora os depósitos de lipídeos (Figuras 23A e 24A), e *alizarin red S*, que cora os cristais de cálcio (Figuras 23B e 24B). Os resultados indicam que as células exibiram robusta diferenciação em linhagens osteogênicas e adipogênicas.

Figura 23 – Diferenciação das CTM-MO. 23A. Coloração por *Oil red O* demonstrando os depósitos de lipídeos em vermelho. 23B. Coloração por *Alizarin red S* demonstrando os cristais de cálcio.

Fonte: Dados não publicados e disponibilizados pela Dra. Érika Rangel.

Figura 24 – Diferenciação das CTM-TA. 24A. Coloração por *Oil red O* demonstrando os depósitos de lipídeos, com controle negativo (CTRL-). 24B. Coloração por *Alizarin red S* demonstrando os cristais de cálcio, com controle negativo (CTRL-).

Fonte: Dados não publicados e disponibilizados pela Dra. Érika Rangel.

5.3 Cultura das CTMs no IPEN

Após os resultados positivos de caracterização e diferenciação das linhagens de CTMs extraídas da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA), o grupo de pesquisa da Dra. Érika Rangel nos disponibilizou *vials* destas linhagens, com passagens inferiores a 10, para que fosse possível a expansão destas células em nossos laboratórios, no CEBIO/IPEN.

As CTMs foram expandidas em nosso laboratório de cultura celular, sob as mesmas condições iniciais, como citado nos Materiais e Métodos, e visualizadas em microscópio de fluorescência. Nas Figuras 25 e 26 podemos observar um exemplo das CTM-MO e das CTM-TA, respectivamente, no qual podemos visualizar seu formato de fuso e sua capacidade de aderir em superfícies poliméricas, como a garrafa de cultura celular. Além disso, também podemos observar estas células emitindo fluorescência vermelha quando excitadas com uma luz verde.

Figura 25 – Visualização das CTM-MO, em passagem 10, em microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse TS100-F*), com aumento de 100x. 25A. Células na luz branca. 25B. Células expressando intensa fluorescência vermelha, após excitação com luz em comprimento de onda de 550 nm.

A

B

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 26 – Visualização das CTM-TA, em passagem 9, em microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse TS100-F*), com aumento de 100x. 25A. Células na luz branca. 25B. Células expressando intensa fluorescência vermelha, após excitação com luz em comprimento de onda de 550 nm.

A

B

Fonte: Autor da dissertação.

5.4 Bionsaio para comparação entre as CTM-MO e as CTM-TA

Os camundongos *oim* heterozigotos, divididos em três grupos (n=5-6 cada), foram submetidos à radiografia para aquisição da densidade óssea e do comprimento dos fêmures iniciais, e quatro horas antes da aplicação das células, submetidos ao processo de irradiação de corpo inteiro. Os animais receberam uma injeção de aproximadamente 1.10^6 de células em cada cômulo femoral, conforme descrito nos Materiais e Métodos. O primeiro grupo recebeu 20 μ L de PBS em cada cômulo femoral; o segundo grupo recebeu 1.10^6 de CTM-TA em 20 μ L de PBS; e o terceiro grupo recebeu 1.10^6 de CTM-MO em 20 μ L de PBS. Vinte dias após a aplicação, os animais foram submetidos, novamente, à radiografia e a densidade óssea foi mensurada.

Um resultado preliminar foi obtido para acompanhamento do tratamento (Figura 27), e podemos observar que houve incremento da densidade óssea nos grupos tratados com as células: $0,22 \pm 0,04$ g/cm³ para as CTM-TA e $0,29 \pm 0,03$ g/cm³ para as CTM-MO. Porém o grupo que recebeu CTM-MO foi o único que apresentou aumento significativo ($P = 0,0011$) em relação ao grupo controle negativo (PBS): $0,13 \pm 0,02$ g/cm³.

Figura 27 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos *oim*, 20 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos cômilos femorais. * $P = 0,0011$, quando comparamos o grupo que recebeu CTM-MO e o grupo controle negativo (PBS).

Fonte: Autor da dissertação.

Após os 45 dias da aplicação das células, os animais foram submetidos novamente à radiografia para aquisição da densidade óssea e do comprimento do fêmur finais. Além disso, os fêmures e quadríceps foram retirados para teste de flexão de três pontos e quantificação das cadeias COL1A1 e COL1A2 do colágeno tipo I. Os resultados da densitometria óssea mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos, uma vez que os valores de incremento foram igualados no final do experimento: $0,44 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$ para as CTM-TA, $0,46 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$ para as CTM-MO e $0,43 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$ para o controle negativo (Figura 28).

Figura 28 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos *oim*, 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Para acompanhamento do crescimento longitudinal dos animais, foram também mensurados a variação de peso ao longo dos 45 dias (Figura 29) e o aumento do comprimento do fêmur (Figura 30). Na Figura 29 podemos observar que os grupos ganharam peso, porém não houve diferença estatística entre eles. As equações das curvas de crescimento foram para o grupo CTM-TA: $Y = -1,067 + 0,2580X - 0,002030X^2$ ($R^2 = 0,9525$), para o grupo CTM-MO: $Y = -0,7708 + 0,3340X - 0,004059X^2$ ($R^2 = 0,9674$); e para o grupo controle negativo (PBS): $Y = -0,8776 + 0,2205X - 0,001581X^2$ ($R^2 = 0,9599$). Já na Figura 30 podemos observar, possivelmente, a ação das CTM-MO em resposta ao crescimento longitudinal através de um aumento significativo ($P=0,0301$) no comprimento dos fêmures deste grupo em relação ao grupo controle negativo.

Figura 29 – Variação de peso dos camundongos *oim*, ao longo dos 45 dias, após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 30 – Variação do comprimento dos fêmures de camundongos *oim*, após 45 dias de aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. * $P=0,0301$, quando comparamos o grupo CTM-MO e o grupo controle negativo (PBS).

Fonte: Autor da dissertação.

Já no teste de flexão de três pontos (Figura 31), houve diferença significativa no grupo que recebeu células do tecido adiposo em relação ao grupo controle negativo, quando avaliadas a extensão da flexão do fêmur até a fratura ($P=0,0028$) e o tempo de quebra ($P=0,0032$) (Figuras 31B e 31C, respectivamente). Esses dados indicam que as CTM-TA, possivelmente, melhoraram a qualidade dos

ossos dos animais tratados. Não houve significância estatística na carga máxima (Figura 31A) suportada pelos fêmures até o momento da fratura.

Figura 31 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures dos camundongos *oim*, após 45 dias da aplicação das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA) ou aplicação de PBS. 31A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura. 31B. Extensão da flexão até a fratura, *P= 0,0028 comparando os grupos CTM-TA e controle negativo. 31C. Tempo até a fratura, *P= 0,0032, também comparando os grupos CTM-TA e controle negativo.

Fonte: Autor da dissertação.

Finalmente, determinamos as concentrações (ng/mL) das cadeias COL1A1 e COL1A2, do colágeno tipo I. Na Figura 32, podemos observar que houve aumento da concentração da cadeia COL1A1 no grupo que recebeu células-tronco provenientes da medula óssea comparado ao grupo que recebeu células-tronco provenientes do tecido adiposo, com valor de $P=0,0281$. A Figura 33 refere-se à dosagem da concentração do colágeno COL1A2, onde não observamos significância estatística entre os grupos. Entretanto, é visível que a concentração média do grupo que recebeu células do tecido adiposo é maior em relação ao grupo controle negativo, indicando, possivelmente, que estas células se diferenciaram, mesmo que em quantidade reduzida, em colágeno heterotrimérico normal.

Figura 32 – Determinação do colágeno COL1A1 dos camundongos *oim* tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS). Houve aumento significativo da concentração do COL1A1 no grupo que recebeu CTM-MO em comparação ao grupo que recebeu CTM-TA, $*P=0,0281$.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 33 – Determinação do colágeno COL1A2 dos camundongos *oim* tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS). Não houve significância estatística entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Os resultados apresentados neste primeiro ensaio foram reunidos nas Tabelas 5 e 6 a seguir, separando os dados por grupo de tratamento e por sexo. A partir destes dados, podemos observar que houve melhora significativa apenas nos machos tratados, fato que nos fez propor um próximo ensaio utilizando apenas camundongos deste sexo.

Tabela 5 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento e por sexo, do bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.

Parâmetro de Tratamento	Controle Negativo (PBS)	n	CTM-TA	n	CTM-MO	n	Significância
Ganho corpóreo (g)		Peso Final – Peso Inicial					
Geral	5,57 ± 1,02	6	6,12 ± 0,67	6	5,79 ± 0,63	5	n.s.
Machos	6,88 ± 1,46	3	6,98 ± 1,88	3	6,99 ± 0,62	2	n.s.
Fêmeas	4,25 ± 1,18	3	5,27 ± 0,29	3	4,99 ± 0,65	3	n.s.
Comprimento do fêmur (mm)		Comp. Final – Comp. Inicial					
Geral	1,98 ± 0,21	6	2,39 ± 0,31	6	2,65 ± 0,16	5	P<0,05*
Machos	2,16 ± 0,15	3	2,88 ± 0,47	3	2,85 ± 0,19	2	P<0,05**
Fêmeas	1,81 ± 0,41	3	1,90 ± 0,32	3	2,51 ± 0,24	3	n.s.
Densidade óssea (g/cm³) – 20 dias		Incremento da densidade óssea					
Geral	0,13 ± 0,02	6	0,22 ± 0,04	6	0,29 ± 0,03	6	P<0,01*
Machos	0,09 ± 0,04	3	0,22 ± 0,07	3	0,39 ± 0,02	2	P<0,01**
Fêmeas	0,16 ± 0,03	3	0,21 ± 0,05	3	0,22 ± 0,02	3	n.s.
Densidade óssea (g/cm³) – 45 dias		Incremento da densidade óssea					
Geral	0,43 ± 0,05	6	0,44 ± 0,04	6	0,46 ± 0,04	6	n.s.
Machos	0,55 ± 0,06	3	0,49 ± 0,06	3	0,51 ± 0,07	2	n.s.
Fêmeas	0,32 ± 0,04	3	0,39 ± 0,04	3	0,43 ± 0,05	3	n.s.

* Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0301.

** Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0235.

* Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0011.

** Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0010.

Fonte: Autor da dissertação.

Tabela 6 – Resultados do teste biomecânico, por grupo de tratamento e por sexo, do bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.

Parâmetro de Tratamento	Controle Negativo (PBS)	n	CTM-TA	n	CTM-MO	n	Significância	
Teste de Flexão de três pontos	Carga Máxima (N)							
	Geral	11,00 ± 1,18	8	11,88 ± 1,15	8	10,92 ± 1,24	6	n.s.
	Machos	13,88 ± 0,77	4	12,75 ± 1,10	4	14,5 ± 0	2	n.s.
	Fêmeas	8,13 ± 0,62	4	11,00 ± 2,12	4	9,13 ± 0,82	4	n.s.
	Extensão da flexão até a fratura (mm)							
	Geral	0,22 ± 0,02	8	0,41 ± 0,04	8	0,29 ± 0,04	6	P<0,01*
	Machos	0,26 ± 0,03	4	0,44 ± 0,06	4	0,25 ± 0,03	2	P<0,05**
	Fêmeas	0,18 ± 0,02	4	0,38 ± 0,08	4	0,31 ± 0,06	4	n.s.
	* Significância do Tecido Adiposo X Controle Negativo, com P=0,0028.							
	** Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0246.							
	Tempo até a fratura (s)							
	Geral	12,94 ± 1,83	8	25,30 ± 2,95	8	17,86 ± 2,70	6	P<0,01*
	Machos	15,95 ± 1,88	4	27,29 ± 3,19	4	15,20 ± 2,10	2	P<0,05**
	Fêmeas	9,93 ± 2,49	4	23,32 ± 5,27	4	19,19 ± 3,96	4	n.s.
	* Significância do Tecido Adiposo X Controle Negativo, com P=0,0032.							
	** Significância da Medula Óssea X Controle Negativo, com P=0,0222.							

Fonte: Autor da dissertação.

5.5 Segundo bioensaio para comparação entre as CTM-MO e as CTM-TA

Os camundongos machos *oim* heterozigotos, divididos em três grupos (n=4-6 cada), foram submetidos à radiografia para aquisição da densidade óssea e comprimento dos fêmures iniciais, e quatro horas antes da aplicação das células, submetidos ao processo de irradiação de corpo inteiro, como descrito em Materiais e Métodos. Os animais receberam uma injeção de aproximadamente 1.10^6 de células em cada côndilo femoral. O primeiro grupo recebeu 20 µL de PBS em cada côndilo femoral; o segundo grupo recebeu 1.10^6 de CTM-TA em 20 µL de PBS; e o terceiro grupo recebeu 1.10^6 de CTM-MO em 20 µL de PBS. Um grupo *wild type*, composto por camundongos C57BL/6J (n=6), foi utilizado como controle positivo.

Após os 45 dias da aplicação das células, os animais foram submetidos novamente à radiografia para aquisição da densidade óssea e do comprimento final

dos fêmures. Além disso, os fêmures e quadríceps foram retirados para teste de flexão de três pontos e quantificação das cadeias COL1A1 e COL1A2, respectivamente.

Os resultados da densitometria óssea mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o controle negativo (PBS) (Figura 34), assim como observado no primeiro ensaio. Entretanto, podemos observar que o controle negativo apresentou um incremento superior ao *wild type*, com $P = 0,0025$.

Figura 34 – Incremento da densidade óssea dos fêmures de camundongos *oim* machos, 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos côndilos femorais. * $P = 0,0025$, quando comparamos o grupo controle negativo (PBS) e o grupo normal, composto por camundongos C57BL/6J.

Fonte: Autor da dissertação.

Foram também mensurados parâmetros de crescimento longitudinal destes animais, como a variação de peso ao longo dos 45 dias (Figura 35), e o aumento do comprimento do fêmur, do corpo e da cauda (Tabela 7). Na Figura 35 podemos observar que os grupos ganharam peso, porém não houve diferença estatística entre eles. As equações das curvas de crescimento foram para o grupo PBS: $Y = -0,4516 + 0,1976X - 0,001983X^2$ ($R^2 = 0,9760$), para o grupo CTM-TA: $Y = -0,4718 + 0,2153X - 0,001958X^2$ ($R^2 = 0,9768$); para o grupo CTM-MO: $Y = -0,4381 + 0,1575X - 0,001335X^2$ ($R^2 = 0,9470$); e para o grupo controle positivo (normal): $Y = -0,1910 + 0,1713X - 0,001250X^2$ ($R^2 = 0,9857$). Já na Tabela 7 podemos observar um crescimento significativo em relação ao comprimento dos fêmures ($P=0,0111$) do grupo que recebeu células-tronco do tecido adiposo em relação ao controle positivo.

Figura 35 – Variação de peso dos camundongos *oim* machos, ao longo dos 45 dias após a aplicação das células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) ou da medula óssea (CTM-MO) ou PBS nos cêndilos femorais, além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Tabela 7 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento, do segundo bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.

Parâmetro de Tratamento	n	Antes do Tratamento	Final do Tratamento	Aumento versus inicial (%)	Significância* ²
Ganho corpóreo (g)					
Controle negativo	6	20,42 ± 4,58	24,61 ± 3,96	20,6	n.s
CTM-TA	6	20,01 ± 3,32	24,97 ± 2,27	24,8	n.s
CTM-MO	4	21,38 ± 2,30	24,85 ± 2,14	16,2	n.s
Controle positivo	6	21,86 ± 1,15	26,62 ± 1,83	21,8	n.s
Comprimento do fêmur *¹ (mm)					
Controle negativo	12	9,81 ± 1,23	11,27 ± 0,89	14,9	n.s
CTM-TA	12	9,93 ± 1,08	11,58 ± 0,77	16,6	P = 0,0111* ³
CTM-MO	8	10,56 ± 0,73	11,86 ± 0,55	12,3	n.s
Controle positivo	12	10,78 ± 0,37	11,79 ± 0,53	9,3	n.s
Comprimento do corpo (mm)					
Controle negativo	6	160,83 ± 11,62	168,87 ± 7,83	5,0	n.s
CTM-TA	6	161,78 ± 9,47	171,52 ± 5,36	6,0	n.s
CTM-MO	4	165,52 ± 1,95	172,48 ± 2,02	4,2	n.s
Controle positivo	6	167,15 ± 2,78	175,64 ± 2,66	5,1	n.s
Comprimento da cauda (mm)					
Controle negativo	6	76,27 ± 4,71	81,54 ± 2,95	6,9	n.s
CTM-TA	6	77,68 ± 4,92	82,74 ± 2,87	6,5	n.s
CTM-MO	4	79,06 ± 1,90	83,31 ± 1,15	5,4	n.s
Controle positivo	6	80,86 ± 1,37	85,06 ± 2,26	5,2	n.s

*¹Fêmures direitos e esquerdo de cada animal.

*² Significância em relação ao grupo controle negativo (PBS).

*³ Significância em relação ao grupo controle positivo.

Fonte: Autor da dissertação.

O teste de flexão de três pontos (Figura 36) foi realizado para avaliação das propriedades biomecânicas dos ossos após o tratamento. Nesta análise foi utilizado o apoio de 0,6 cm para aplicação da força, diferentemente da primeira análise, na qual utilizamos o apoio de 0,8 cm, pois os ossos estavam menores do que os do primeiro ensaio. Observamos novamente a diferença significativa no grupo CTM-TA em relação ao grupo controle negativo, quando avaliadas a extensão da flexão do fêmur até a fratura ($P=0,0248$) e no tempo de quebra ($P=0,0387$) (Figuras 36B e 36C, respectivamente). Além disso, também observamos que os valores dos parâmetros analisados do grupo controle positivo (normal) se mostraram significativos em relação aos demais grupos nesses dois parâmetros: i) extensão da flexão: $P < 0,0001$ (normal *versus* PBS); $P = 0,0440$ (normal *versus* CTM-TA); e $P = 0,0014$ (normal *versus* CTM-MO). ii) tempo de

quebra: $P = 0,0002$ (normal *versus* PBS) e $P = 0,0023$ (normal *versus* CTM-MO) . Novamente, não foi observada significância estatística na carga máxima (Figura 36A) suportada pelos fêmures até o momento da fratura.

Desta forma, observamos que no caso da extensão da flexão até a fratura e do tempo suportado até a fratura, as CTM-TA apresentaram maior eficiência comparadas às CTM-MO.

Figura 36 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures de camundongos *oim* machos, após a aplicação das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA) ou aplicação de PBS, além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. 36A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura. 36B. Extensão da flexão até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com $*P = 0,0002$; teste t nos demais grupos: $**P = 0,0248$ CTM-TA *versus* PBS; $***P < 0,0001$ normal *versus* PBS; $****P = 0,0440$ normal *versus* CTM-TA; e $*****P = 0,0014$ normal *versus* CTM-MO. 36C. Tempo até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com $*P = 0,0007$; teste t nos demais grupos: $**P = 0,0387$ CTM-TA *versus* PBS; $***P = 0,0002$ normal *versus* PBS; $****P = 0,0023$ normal *versus* CTM-MO.

Fonte: Autor da dissertação.

Finalmente, quantificamos as concentrações das cadeias COL1A1 e COL1A2, do colágeno tipo I. Na Figura 37, podemos observar que houve significância estatística pelo teste ANOVA com $P=0,0311$, quando avaliamos os níveis de COL1A1. Além disso, houve também significância estatística nas comparações entre as CTM-MO *versus* CTM-TA, com $P=0,0345$, e na comparação das CTM-MO *versus* controle positivo (normal), com $P=0,0380$. Não houve diferença estatística nos demais grupos.

Figura 37 – Determinação da cadeia COL1A1 nos camundongos *oim* machos tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS) e grupo normal (controle positivo), composto por camundongos C57BL/6J. Houve diferença significativa entre os grupos através do teste ANOVA, com $*P=0,0311$; e pelo teste t entre o grupo que recebeu CTM-MO em comparação ao grupo que recebeu CTM-TA, $**P=0,0346$ e o grupo controle positivo, com $***P=0,0380$.

Fonte: Autor da dissertação.

Já na análise da concentração do COL1A2 (Figura 38), curiosamente o grupo controle negativo (PBS) expressou uma concentração muito alta, se pensarmos que ele produz mais colágeno homotrimérico, ou seja, possui deficiência na produção da cadeia $\alpha 2(I)$. Houve apenas significância estatística entre o grupo controle negativo *versus* o grupo que recebeu as CTM-MO, com $P=0,0320$. E novamente, podemos observar que o grupo CTM-TA apresentou uma expressão maior de COL1A2 em relação às CTM-MO e o grupo positivo, porém não significativo.

Figura 38 – Determinação da cadeia COL1A2 nos camundongos *oim* tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ou do tecido adiposo (CTM-TA), ou solução salina (PBS) e grupo normal (controle positivo). Houve diferença significativa apenas entre o grupo controle negativo e o CTM-MO, com $*P= 0,0320$.

Fonte: Autor da dissertação.

Em relação à quantificação da cadeia COL1A1 houve diferença significativa a favor das CTM-MO, enquanto a cadeia COL1A2 foi expressa em maior quantidade nas CTM-TA, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa.

Os resultados apresentados foram reunidos na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Resultados, por grupo de tratamento, do segundo bioensaio para comparação entre as CTM-TA e as CTM-MO.

Parâmetro de Tratamento e Grupo	n	Média ± desvio padrão	Aumento <i>versus</i> inicial (%)	Significância* ¹
Densidade Óssea (g/cm³) *²				
Controle negativo	6	0,30 ± 0,12	25,7	P = 0,0025* ³
CTM-TA	6	0,25 ± 0,14	22,5	n.s* ⁴
CTM-MO	4	0,20 ± 0,15	16,9	n.s
Controle positivo	6	0,18 ± 0,05	14,7	
Teste de Flexão de três pontos				
Carga Máxima (N)				
Controle negativo	6	11,5 ± 3,61		n.s
CTM-TA	6	13,0 ± 2,12		n.s
CTM-MO	4	12,0 ± 2,16		n.s
Controle positivo	6	12,92 ± 3,35		n.s
Extensão da flexão até a fratura (mm)				
Controle negativo	6	0,18 ± 0,03		n.s
CTM-TA	6	0,24 ± 0,04		P = 0,0248
CTM-MO	4	0,20 ± 0,03		n.s
Controle positivo	6	0,28 ± 0,02		P < 0,0001; P = 0,0440* ⁵ ; P = 0,0014* ⁶
Tempo até a fratura (s)				
Controle negativo	6	11,52 ± 1,86		n.s
CTM-TA	6	14,52 ± 2,26		P = 0,0387
CTM-MO	4	12,34 ± 2,03		n.s
Controle positivo	6	16,71 ± 1,16		P = 0,0002; P = 0,0023* ⁶
COL1A1 (ng/mL)				
Controle negativo	6	23,73 ± 8,77		n.s
CTM-TA	6	20,95 ± 8,83		n.s
CTM-MO	4	40,64 ± 15,94		P = 0,0346 * ⁵
Controle positivo	6	22,42 ± 7,40		P = 0,0380 * ³
COL1A2 (ng/mL)				
Controle negativo	6	64,71 ± 15,30		P = 0,0320 * ⁶
CTM-TA	6	63,14 ± 39,31		n.s
CTM-MO	4	39,31 ± 14,98		n.s
Controle positivo	6	45,80 ± 20,30		n.s

*¹ Significância em relação ao grupo controle negativo (PBS).*² Incremento da densidade óssea (DMO final – DMO inicial).*³ Significância em relação ao grupo normal.*⁴ n.s – não significativo.*⁵ Significância em relação ao grupo CTM-TA.*⁶ Significância em relação ao grupo CTM-MO.**Fonte:** Autor da dissertação.

5.6 Bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica

De acordo com os resultados obtidos referentes à biomecânica do osso dos camundongos tratados (teste biomecânico e quantificação da cadeia $\alpha 2$ (I)), decidimos adotar as CTM-TA como o melhor tipo de CTMs para a terapia celular associada à terapia gênica *in vivo*.

Camundongos *oim* heterozigotos (n=31) e camundongos C57BL/6J (n=5), com idades entre 35 a 76 dias, foram organizados em cinco grupos (n=5-8 cada), conforme ilustrado no item Materiais e Métodos. No dia zero, os animais dos grupos experimentais 1 e 2 foram irradiados conforme descrito anteriormente, e aproximadamente quatro horas após, receberam uma injeção em cada côndilo femoral, de aproximadamente 1.10^6 células em 20 μ L de PBS. Uma semana após, os grupos experimentais 2 e 3 receberam duas injeções do plasmídeo pUC-UBI-mGH (50 μ g/20 μ L) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação, conforme descrito previamente. O grupo controle negativo (grupo 4), recebeu no dia zero uma injeção em cada côndilo femoral contendo 20 μ L de PBS e uma semana após, duas injeções de PBS (20 μ L) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação. Os camundongos C57BL/6J foram utilizados como controle positivo do bioensaio.

Trinta dias após a primeira eletroporação, os grupos experimentais 2 e 3 receberam, novamente, duas injeções do plasmídeo pUC-UBI-mGH (50 μ g/20 μ L) em cada músculo tibial, seguido de eletroporação. Assim como o grupo controle negativo, recebeu duas injeções de PBS (20 μ L) em cada músculo tibial, seguido também de eletroporação.

Após 60 dias do bioensaio, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para dosagens séricas de mGH e de mIGF-I. Os fêmures e quadríceps também foram retirados para teste de flexão de três pontos e quantificação das cadeias COL1A1 e COL1A2, respectivamente. Além disso, ao longo do bioensaio foram mensuradas a variação de peso e o aumento do comprimento do corpo e da cauda dos animais.

Na Figura 39 podemos observar a variação de peso por grupo ao longo do tratamento. Observa-se que os grupos ganharam peso, e houve diferença significativa quando comparamos o grupo tratado com as CTM-TA associadas à

eletroporação do gDNA mGH em relação ao grupo controle positivo ($P = 0,0023$); quando comparamos o grupo tratado com apenas as CTM-TA com o grupo controle positivo ($P = 0,0189$); e quando comparamos o grupo tratado com DNA plasmidial e o controle positivo ($P = 0,0438$). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e o controle negativo, assim como o controle positivo *versus* negativo.

Figura 39 – Variação de peso dos camundongos *oim* ao longo dos 60 dias após o tratamento com as células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA), associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA), além dos grupos controle negativo (PBS) ou positivo (normal, composto por camundongos C57BL/6J).

Fonte: Autor da dissertação.

As equações das curvas de crescimento foram para o grupo PBS: $Y = 0,1213 + 0,07967X - 0,0001201X^2$ ($R^2 = 0,9695$), para o grupo CTM-TA: $Y = -0,1185 + 0,1361X - 0,0006092X^2$ ($R^2 = 0,9918$); para o grupo CTM-TA + DNA: $Y = 0,02846 + 0,1355X - 0,0005661X^2$ ($R^2 = 0,9882$); para o grupo DNA: $Y = -0,2159 + 0,08788X - 1,189 \cdot 10^{-6}X^2$ ($R^2 = 0,9764$); e para o grupo controle positivo (normal): $Y = -0,2277 + 0,1046X - 0,0007124X^2$ ($R^2 = 0,9801$).

Na Tabela 9 podemos observar outros parâmetros de crescimento, como a variação do comprimento do corpo e da cauda entre os grupos. A variação do comprimento do corpo foi significativa pelo teste ANOVA ($P = 0,0261$) quando

comparamos a variação em mm entre todos os grupos. Além disso, esta variação também foi significativa quando comparamos o grupo tratado com as CTM-TA associadas a eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA) em relação a outros grupos, através do teste t de *Student*. A variação do comprimento do corpo do grupo CTM-TA + DNA foi significativa ($P = 0,0143$) em comparação ao grupo tratado apenas com as CTM-TA. Assim como em relação aos grupos controle negativo ($P = 0,0013$), DNA ($P = 0,0407$) e o controle positivo ($P = 0,0091$).

Tabela 9 – Parâmetros de crescimento, por grupo de tratamento, do bioensaio de avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica.

Parâmetro de Tratamento	n	Antes do Tratamento	Final do Tratamento	Aumento versus inicial (%)	Significância*1
Ganho corpóreo (g)					
Controle negativo	7	19,60 ± 3,35	24,74 ± 3,88	26,2	n.s
CTM-TA	8	17,14 ± 3,30	23,22 ± 3,21	35,5	$P = 0,0189$ *2
CTM-TA + DNA	8	16,42 ± 2,89	23,28 ± 2,81	41,7	$P = 0,0023$ *2
DNA	8	18,14 ± 5,29	23,67 ± 5,22	30,5	$P = 0,0438$ *2
Controle positivo	5	18,18 ± 1,19	21,87 ± 0,73	20,3	n.s
Comprimento do corpo (mm)					
Controle negativo	7	161,08 ± 5,89	171,56 ± 3,04	6,5	n.s
CTM-TA	8	156,57 ± 8,94	167,36 ± 6,45	6,9	n.s
CTM-TA + DNA	8	150,28 ± 5,43	169,24 ± 2,96	12,6	$P = 0,0091$ *2; $P = 0,0013$ *3; $P = 0,0143$ *4; $P = 0,0407$ *5
DNA	8	155,24 ± 10,44	168,23 ± 6,24	8,4	n.s
Controle positivo	5	160,93 ± 1,8	173,21 ± 1,63	7,6	n.s
Comprimento da cauda (mm)					
Controle negativo	7	73,24 ± 1,69	81,15 ± 4,23	11	n.s
CTM-TA	8	72,58 ± 3,61	79,34 ± 1,92	9,5	n.s
CTM-TA + DNA	8	70,11 ± 3,43	81,04 ± 2,29	15,6	$P = 0,0178$ *2; $P = 0,0242$ *4; $P = 0,0282$ *5
DNA	8	72,49 ± 3,09	79,34 ± 1,37	9,4	n.s
Controle positivo	5	76,25 ± 1,06	82,83 ± 0,99	8,6	n.s

*1 Significância entre os grupos, através do teste t de *Student*.

*2 Significância em relação ao grupo controle positivo (normal).

*3 Significância em relação ao grupo controle negativo (PBS).

*4 Significância em relação ao grupo CTM-TA.

*5 Significância em relação ao grupo DNA.

Fonte: Autor da dissertação.

Sobre o comprimento da cauda, houve apenas diferença estatística entre o grupo tratado com as CTM-TA associadas à eletroporação do gDNA mGH

(CTM-TA + DNA) em relação aos grupos CTM-TA ($P = 0,0242$), DNA ($P = 0,0282$) e controle positivo ($P = 0,0178$).

Esses resultados mostram que o transplante das CTM-TA associadas à eletroporação do DNA plasmidial contendo o gDNA mGH foi capaz de melhorar os parâmetros de crescimento dos animais portadores de OI.

Além disso, na avaliação das propriedades biomecânicas dos fêmures destes animais, realizada pelo teste de flexão de três pontos (Figura 40), podemos observar que a associação entre as terapias gênica *in vivo* e celular foi significativa para todos os parâmetros avaliados quanto à melhora da qualidade óssea dos camundongos *oim* heterozigotos. Em relação à carga máxima suportada pelos fêmures até o momento da fratura (Figura 40A), podemos observar uma tolerância significativa no grupo tratado com as CTM-TA associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA) em relação ao controle negativo, com $P = 0,0420$. Não havíamos observado resultado significativo sobre este parâmetro nos ensaios anteriores de comparação entre as duas CTMs. Da mesma forma, podemos observar que na avaliação da flexibilidade dos fêmures através da extensão da flexão do osso até a fratura (Figura 40B), o grupo CTM-TA + DNA novamente se mostrou mais flexível do que o controle negativo ($P = 0,0145$), e o grupo tratado apenas com DNA ($P = 0,0415$). Além disso, o controle positivo se mostrou mais flexível também em relação a esses dois grupos: controle negativo ($P = 0,0012$) e DNA ($P = 0,0110$). E na avaliação do tempo suportado pelos fêmures até a fratura (Figura 40C), novamente visualizamos uma diferença significativa entre o grupo CTM-TA + DNA *versus* o controle negativo ($P = 0,0157$), assim como do controle positivo em relação aos grupos CTM-TA ($P = 0,0419$), DNA ($P = 0,0147$) e controle negativo ($P = 0,0006$). Outra característica interessante observada nestes resultados é a proximidade dos valores médios obtidos pelo grupo CTM-TA + DNA em relação ao controle positivo: i) extensão da flexão $0,283 \pm 0,06$ mm para CTM-TA + DNA *versus* $0,290 \pm 0,03$ mm para controle positivo; ii) tempo até a fratura $17,19 \pm 3,73$ s para CTM-TA + DNA *versus* $17,74 \pm 1,79$ s para controle positivo. Coletivamente, esses dados mostram que a terapia proposta não só aparentemente melhorou a qualidade óssea dos animais, mas permitiu que esta qualidade se aproximasse de um animal normal.

Figura 40 – Teste de flexão de três pontos realizado nos fêmures dos camundongos *oim* 60 dias após o tratamento com as células-tronco provenientes do tecido adiposo (CTM-TA), associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA), além dos grupos controle negativo (PBS) ou positivo (normal, composto por camundongos C57BL/6J). 40A. Carga máxima suportada pelos fêmures até a fratura, com valor significativo na comparação CTM-TA + DNA *versus* PBS, * $P = 0,0420$. 40B. Extensão da flexão até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com * $P = 0,0080$; teste t nos demais grupos: ** $P = 0,0145$ CTM-TA + DNA *versus* PBS; *** $P = 0,0012$ normal *versus* PBS; **** $P = 0,0415$ CTM-TA + DNA *versus* DNA; e ***** $P = 0,0110$ normal *versus* DNA. 40C. Tempo até a fratura; teste ANOVA entre os grupos com * $P = 0,0100$; teste t nos demais grupos: ** $P = 0,0157$ CTM-TA + DNA *versus* PBS; *** $P = 0,0006$ normal *versus* PBS; **** $P = 0,0419$ normal *versus* CTM-TA; e ***** $P = 0,0147$ normal *versus* DNA.

Fonte: Autor da dissertação.

As dosagens séricas de mGH e de mIGF-I, obtidas através de ELISAs específicos, foram realizadas para avaliar a atividade do plasmídeo pUC-UBI-mGH após os 60 dias de tratamento. Na Figura 41 estão os níveis de expressão do mGH por grupo de tratamento, enquanto na Figura 42 estão os da expressão do mIGF-I. Não houve diferença significativa entre os grupos para os dois hormônios, uma vez que os animais utilizados não possuem deficiência de mGH ou mIGF.

Figura 41 – Quantificação do mGH sérico após 60 dias de bioensaio, em camundongos *oim* heterozigotos tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 42 – Quantificação do mIGF-I sérico após 60 dias de bioensaio, em camundongos *oim* heterozigotos tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Por fim, foram determinadas as concentrações das cadeias COL1A1 e COL1A2, do colágeno tipo I, a partir da extração proteica nos músculos quadríceps dos camundongos *oim* heterozigotos. Na Figura 43, podemos observar que não houve diferença estatística na expressão da cadeia COL1A1 entre os grupos experimentais e os controles.

Figura 43 – Determinação dos níveis de expressão da cadeia COL1A1 nos camundongos *oim* tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Autor da dissertação.

Já na análise da expressão da cadeia COL1A2 (Figura 44), podemos verificar que houve diferença significativa na expressão da cadeia entre todos os grupos, pelo teste ANOVA ($P = 0,0044$), assim como quando analisamos os grupos separadamente através do teste t de *Student*. Houve diferença estatística na expressão da cadeia COL1A2 pelo grupo tratado apenas com as CTM-TA em relação ao grupo DNA ($P = 0,0299$); na expressão do grupo tratado com as CTM-TA associadas à eletroporação do gDNA mGH quando comparadas ao grupo DNA ($P < 0,0001$) e ao grupo controle negativo (PBS) ($P = 0,0274$); e na expressão do controle negativo ($P = 0,0015$) e controle positivo ($P = 0,0017$) em relação ao grupo DNA. Porém não houve diferença significativa entre CTM-TA + DNA *versus* CTM-TA.

Figura 44 – Expressão da cadeia COL1A2 nos camundongos *oim* tratados com as CTM-TA associadas à eletroporação de gDNA mGH (CTM-TA + DNA), apenas com as células (CTM-TA), apenas gDNA mGH (DNA) ou PBS (controle negativo), além do grupo controle positivo (normal), composto por camundongos C57BL/6J. Houve diferença significativa entre os grupos através do teste ANOVA, com $*P = 0,0044$; e pelo teste t entre o grupo que recebeu CTM-TA em comparação ao grupo que recebeu DNA ($**P=0,0299$); entre o grupo CTM-TA + DNA em relação aos grupos DNA ($***P < 0,0001$) e o grupo PBS ($****P = 0,0274$); e entre os grupos PBS ($*****P = 0,0015$) e normal ($*****P = 0,0017$) em relação ao grupo DNA.

Fonte: Autor da dissertação.

Os resultados obtidos neste bioensaio de avaliação pré-clínica foram reunidos nas Tabelas 10 e 11 a seguir.

Tabela 10 – Resultados do teste biomecânico, por grupo de tratamento, após bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica.

Parâmetro de tratamento e grupo		n	Média ± desvio padrão	Significância* ¹
Teste de Flexão de três pontos	Carga Máxima (N)			
	Controle negativo	7	9,0 ± 3,21	n.s
	CTM-TA	8	12,0 ± 2,39	n.s
	CTM-TA + DNA	8	12,2 ± 2,24	P = 0,0420 * ²
	DNA	8	10,5 ± 2,98	n.s
	Controle positivo	5	11,6 ± 0,89	n.s
	Extensão da flexão até a fratura (mm)			
	Controle negativo	7	0,21 ± 0,03	n.s
	CTM-TA	8	0,24 ± 0,04	n.s
	CTM-TA + DNA	8	0,28 ± 0,06	P = 0,0145 * ² ; P = 0,0415 * ³
	DNA	8	0,23 ± 0,04	n.s
	Controle positivo	5	0,29 ± 0,03	P = 0,0012 * ² ; P = 0,0110 * ³
	Tempo até a fratura (s)			
	Controle negativo	7	12,97 ± 1,55	n.s
	CTM-TA	8	14,56 ± 2,72	n.s
	CTM-TA + DNA	8	17,19 ± 3,73	P = 0,0157 * ²
	DNA	8	14,0 ± 2,5	n.s
	Controle positivo	5	17,74 ± 1,79	P = 0,0006 * ² ; P = 0,0147 * ³ ; P = 0,0419 * ⁴

*¹Significância entre os grupos, através do teste t de *Student*.

*² Significância em relação ao grupo controle negativo (PBS).

*³ Significância em relação ao grupo DNA.

*⁴ Significância em relação ao grupo CTM-TA.

n.s – Não significativo / n - número

Fonte: Autor da dissertação.

Tabela 11 – Dosagens das proteínas, por grupo de tratamento, após bioensaio para avaliação pré-clínica da OI pela associação da infusão de células e da terapia gênica

Proteína dosada e grupo de tratamento	n	Média ± desvio padrão	Significância* ¹
COL1A1 (ng/mL)			
Controle negativo	7	28,62 ± 10,97	n.s
CTM-TA	8	36,59 ± 13,84	n.s
CTM-TA + DNA	8	34,93 ± 16,17	n.s
DNA	8	34,79 ± 10,06	n.s
Controle positivo	5	30,16 ± 20,39	n.s
COL1A2 (ng/mL)			
Controle negativo	7	92,65 ± 13,6	P = 0,0015 * ³
CTM-TA	8	102,14 ± 39,93	P = 0,0299 * ³
CTM-TA + DNA	8	119,30 ± 23,03	P = 0,0274 * ² ; P < 0,0001 * ³
DNA	8	66,97 ± 9,99	n.s
Controle positivo	5	106,55 ± 24,67	P = 0,0017 * ³
mGH (ng/mL)			
Controle negativo	7	9,56 ± 10,89	n.s
CTM-TA	8	9,98 ± 8,03	n.s
CTM-TA + DNA	8	22,91 ± 19,36	n.s
DNA	8	8,31 ± 7,38	n.s
Controle positivo	5	8,57 ± 6,15	n.s
miGF-I (ng/ mL)			
Controle negativo	7	409,49 ± 99,27	n.s
CTM-TA	8	366,76 ± 75,83	n.s
CTM-TA + DNA	8	406,14 ± 46,8	n.s
DNA	8	367,70 ± 47,74	n.s
Controle positivo	5	390,20 ± 49,37	n.s

*¹Significância entre os grupos, através do teste t de *Student*.*² Significância em relação ao grupo controle negativo (PBS).*³ Significância em relação ao grupo DNA.

n.s – Não significativo / n – número

Fonte: Autor da dissertação.

6 DISCUSSÃO

A osteogênese imperfeita (OI) é uma desordem genética, que atinge o tecido conjuntivo como um todo, altamente heterogênea e com um grande número de mutações, muitas das quais são herdadas de forma dominante, causando um amplo espectro de gravidade da doença. Estas mutações ocorrem, principalmente, em genes responsáveis pela síntese e processamento do colágeno tipo I, assim como na diferenciação e maturação de osteoblastos, responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (MARINI et al., 2017). Há evidências crescentes de que a fragilidade óssea, característica marcante em pacientes com a OI, especialmente em pacientes com formas mais graves da doença, é causada por uma combinação de fatores que contribuem para a produção insuficiente e alterada do colágeno tipo I, além do processamento inadequado e estresse celular causado pela produção do colágeno mutante, o que afeta a diferenciação dos osteoblastos (LI, H. et al., 2010; SINDER et al., 2019). Essas características fazem com que esta patologia seja um desafio quanto ao direcionamento das abordagens terapêuticas empregadas para seu tratamento. Estas abordagens, atualmente, são direcionadas ao tratamento apenas sintomático, e embora melhorem aspectos da qualidade de vida do paciente, como dor, mobilidade e incidência de fraturas, não atuam na matriz desorganizada do colágeno tipo I, que se configura como principal causa da fragilidade óssea na doença, além de trazerem efeitos colaterais bastante desconfortáveis aos pacientes.

Neste trabalho, pela primeira vez, buscamos por meio da associação entre a terapia gênica *in vivo* e o transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs), alternativas que melhorem não apenas a qualidade terapêutica de indivíduos portadores da OI, mas também uma fonte alternativa para obtenção de osteoblastos saudáveis e colágeno tipo I funcional.

As metodologias empregadas aqui foram baseadas na literatura disponível, assim como, e sobretudo, na recente experiência do nosso grupo de terapia gênica na entrega *in vivo* de DNA plasmidial contendo o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) para tratamento de OI, em modelo murino para a OI tipo I, os camundongos *oim* (JESUS, 2020). Além de aprimoramentos e experiências vivenciadas por nosso grupo, ao longo de 10 anos, através do desenvolvimento de protocolos de ensaios pré-clínicos para tratamento da

deficiência do hormônio de crescimento (GH) em modelo murino (OLIVEIRA et al., 2010; HIGUTI et al., 2012; CECCHI et al., 2014; HIGUTI et al., 2016; CECCHI et al., 2017; LIMA et al., 2020; ZACARIAS, 2020).

Primeiramente, avaliamos duas linhagens de células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas de tecidos diferentes, medula óssea (CTM-MO) e tecido adiposo (CTM-TA), em relação ao seu potencial de melhorar a qualidade óssea em modelo murino de Ol. Estas células foram inicialmente extraídas, cultivadas e caracterizadas de acordo com os critérios mínimos para a caracterização das CTMs (DOMICINI et al., 2006) pelo grupo de pesquisa da Dra. Érika Rangel, do Hospital Albert Einstein. Ambas as linhagens apresentaram os marcadores de superfície característicos das CTMs murinas (BOXALL & JONES, 2012) e se diferenciaram em linhagens osteogênicas e adipogênicas quando induzidas *in vitro* durante a cultura celular condicionada, o que demonstra, assim, suas potencialidades de célula-tronco (STRIOGA et al., 2012). Em seguida, *vials* destas linhagens foram disponibilizados para expansão em nossos laboratórios.

As CTMs, no geral, exibem grande potencial em terapias de reparo tecidual devido as suas propriedades de autorrenovação, diferenciação, migração e liberação de fatores de crescimento que proporcionam um microambiente adequado para a regeneração do tecido prejudicado (WANG et al., 2011; MAZINI et al., 2019). E, embora ambas as linhagens apresentem as mesmas propriedades de células-tronco mesenquimais, características individuais de ambas as células são importantes para determinar a escolha durante a aplicação terapêutica. Uma destas características é a fonte de obtenção. O tecido adiposo é uma das fontes mais promissoras para obtenção das CTMs, por requerer técnicas menos invasivas e apresentar maior rendimento, quando comparado à medula óssea (KERN et al., 2006). Depósitos de tecido adiposo subcutâneo são acessíveis, abundantes e reabastecíveis, fornecendo, assim, um reservatório potencial de células-tronco para cada indivíduo (CHEN et al., 2011). Além disso, em estudos de comparação entre as duas células, as CTM-TA apresentaram maior capacidade de renovação e proliferação do que as CTM-MO (KERN et al., 2006; NAKANISHI et al., 2011; VIDAL et al., 2012). KERN e colaboradores (2006) demonstraram que a taxa de senescência das CTM-MO é cerca de quatro vezes maior do que das CTM-TA em até duas passagens. Em corroboração, VIDAL e colaboradores (2012) descreveram que a capacidade de autoreplicação destas células pode estar ligada

à atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência, uma vez que foi observada a atividade desta enzima após 70 duplicações da população celular de CTM-TA, enquanto que na cultura de CTM-MO foi observada a atividade desta enzima durante, apenas, 30 duplicações. Além disso, NAKANISHI e colaboradores (2011) observaram que as CTM-TA proliferavam mais rapidamente do que as CTM-MO, obtendo, aproximadamente, 10 vezes mais células em 40 dias. Embora STRIOGA e colaboradores (2012), em revisão bibliográfica, tenham descrito que alguns autores divergem quanto à potencialidade osteogênica entre as linhagens, demonstrando, em alguns casos, que as CTM-MO são mais osteogênicas que as CTM-TA *in vitro*, e em outros, que a resposta osteogênica é a mesma, nenhum dos autores mencionados acima observou diferenças significativas em relação à capacidade de diferenciação osteogênica entre estas células. Desta forma, sobre a capacidade osteogênica destas duas linhagens, podemos apenas dizer que ambas possuem o potencial de diferenciação quando induzidas condicionalmente.

Embora as CTM-TA se configurem como uma opção sólida para a terapia celular, devido à sua abundância, fácil obtenção e alta capacidade proliferativa (KERN et al., 2006), não há registros da utilização desta linhagem no tratamento de OI na literatura. Portanto, a avaliação inicial entre as duas linhagens de CTMs descritas aqui se faz necessária para compreender o papel das CTM-TA como sujeito da terapia celular proposta. Diante disso, realizamos bioensaios para comparação entre as duas linhagens em modelo murino de OI para avaliar quais delas apresentavam melhores resultados quanto à qualidade óssea destes animais, os camundongos *oim*.

No primeiro bioensaio para comparação entre as duas linhagens celulares, foram obtidos, inicialmente, melhores resultados pelo transplante das CTM-MO ($0,29 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$) em relação às CTM-TA ($0,22 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$) e ao controle negativo ($0,13 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$) quanto ao aumento da densidade mineral óssea (DMO) em 20 dias de ensaio, sendo este resultado significativo ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo. Entretanto, no final do ensaio, 45 dias após o transplante celular, pudemos observar que houve aumento da DMO independentemente do tratamento, e igualdade entre os valores de incremento nos grupos tratados: $0,44 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$ para as CTM-TA e $0,46 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$ para as CTM-MO, assim como no controle negativo ($0,43 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$).

Em estudos anteriores, foram observados aumentos significativos da DMO em pacientes portadores de OI do tipo III quando tratados com CTMs provenientes do conteúdo total da medula óssea (HORWITZ et al., 1999 e 2001), porém esse aumento não foi observado quando as CTMs foram purificadas das porções hematopoiéticas (HORWITZ et al., 2002), assim como também não foi observado aumento significativo da DMO em camundongos Col1a2^{+/G610C}, outro modelo murino para a OI, que recebeu transplante de CTMs da medula óssea (LEE et al., 2018). Além disso, também não foi observado aumento significativo em camundongos *oim* que receberam CTMs obtidas do líquido amniótico humano (RANZONI et al., 2016).

Curiosamente, no segundo bioensaio realizado em camundongos machos *oim* heterozigotos para comparação entre essas duas linhagens, foi obtido um aumento significativo ($P < 0,05$) no incremento da DMO para o controle negativo ($0,30 \pm 0,12 \text{ g/cm}^3$) em relação aos camundongos normais ($0,18 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$).

Contudo, este dado negativo não implica no insucesso das linhagens de CTMs para o tratamento da OI. Outros parâmetros relacionados à qualidade estrutural do osso, mostraram resultados bastante promissores das CTMs obtidas da medula óssea (LI, F. et al., 2010; PAULEY et al., 2014; SINDER et al., 2019) e de outros tecidos (RANZONI et al., 2016).

A densidade mineral óssea é a quantificação da massa do osso, expressa em g/cm^3 , que é influenciada pelo conteúdo mineral ósseo (CMO). Ossos longos, como os fêmures, são formados por osso cortical e osso esponjoso. O osso cortical é a região mais densa e compacta do osso, localizado nas camadas externas, e possui a função de manter a estrutura rígida dos ossos longos. Já o osso esponjoso ou trabecular está localizado no interior dos ossos e possui a função de manter a força e a elasticidade dos ossos longos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Em camundongos *oim* heterozigotos, os ossos longos são caracterizados por apresentarem uma espessura cortical significativamente maior do que em animais normais (CAMACHO et al., 1999). Consequentemente, estes animais apresentam o CMO levemente maior do que os camundongos *oim* homozigotos (CAMACHO et al., 1999). SABAN e colaboradores (1996) também descreveram que a espessura do osso cortical das diáfises de tibias em camundongos *oim* heterozigotos não apresentavam aparente diferença em relação aos animais normais. Coletivamente, estes dados podem explicar, pelo menos em

parte, o aumento significativo do incremento da densidade óssea do controle negativo em relação ao controle positivo, assim como sobre os demais grupos experimentais. Uma abordagem interessante para melhor avaliar este parâmetro seria utilizar camundongos *oim* homozigotos como sujeito dos tratamentos abordados, uma vez que este modelo apresenta osso cortical significativamente mais fino e com poucas trabéculas ao longo de seus fêmures e tíbias, em comparação ao animal normal e o heterozigoto (CHIPMAN et al., 1993; SABAN et al., 1996).

Além disso, outros fatores relacionados aos instrumentos utilizados para mensurar a DMO podem oferecer erros nas medições. PACCINI e GLANER (2008) reuniram uma coletânea de estudos que mostraram algumas limitações no uso da absorptometria de raio-X de dupla energia (DEXA) na acurácia da densidade mineral óssea, técnica que utilizamos em nossas análises da DMO, o que poderia, também, explicar os resultados controversos obtidos neste trabalho.

Em relação aos parâmetros de crescimento, embora tenhamos observado diferenças em relação aos ganhos corpóreos entre os grupos experimentais em relação ao controle negativo, principalmente no primeiro bioensaio de 45 dias para comparação entre as CTMs, não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação destes parâmetros. Assim como não observamos diferença no comprimento longitudinal (corpo e cauda) destes animais. Embora, na OI humana, a baixa estatura seja um fenótipo bastante característico, principalmente em tipos mais severos da doença, tipo III e IV por exemplo (MARINI et al., 2017), no modelo murino *oim*, esta característica é visível apenas em camundongos *oim* homozigotos, enquanto o heterozigoto é fenotipicamente semelhante ao animal normal (CHIPMAN et al., 1993; SABAN et al., 1996). Já em relação ao comprimento dos fêmures pudemos observar que ao final do primeiro ensaio, houve diferença significativa ($P < 0,05$) no crescimento do grupo tratado com as CTM-MO ($2,65 \pm 0,16$ mm) em relação ao controle negativo ($1,98 \pm 0,21$ mm). Entretanto, no segundo ensaio este crescimento foi significativo ($P < 0,05$) na avaliação do grupo tratado com as CTM-TA ($1,65 \pm 0,62$ mm) em relação ao controle positivo ($1,00 \pm 0,51$ mm). Estes resultados indicam que ambas as células podem possuir a capacidade de promover crescimento longitudinal dos ossos.

Os camundongos *oim* heterozigotos e normais (C57BL/6J) que utilizamos em ambos os ensaios tinham entre 1 a 3 meses de vida, portanto ainda

não tinham completado o estado estacionário de crescimento, que ocorre entre 4 e 5 meses de idade (LUPU et al., 2001). Desta forma, a injeção local das CTMs pode ter promovido maior formação óssea, ou seja, maior deposição de osso novo sobre a cartilagem epifisária, a ossificação endocondral. OTSURU e colaboradores (2012) mostraram que a infusão de CTMs provenientes da medula óssea indiretamente estimula a proliferação de condrócitos na placa de crescimento em camundongos *oim* homozigotos, e conseqüentemente, promove o crescimento ósseo. Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que as CTMs secretam fatores tróficos. O primeiro fator trófico foi indentificado pelos pesquisadores como microRNAs (miRNA), dentro de vesículas extracelulares, secretados pelas próprias CTMs. Estes miRNAs induzem um fator secundário desconhecido que estimula a proliferação de condrócitos na placa de crescimento (OTSURU et al., 2017).

Além disso, três fatores transcricionais específicos (RUNX2, *Osx* e *Dlx5*) regulam múltiplas vias de sinalização envolvendo a diferenciação osteogênica das CTMs, como a *Wnt* (HUTCHINGS et al., 2020). Esta via de sinalização desempenha um importante papel na diferenciação osteogênica e condrogênica de células progenitoras, regulando, por exemplo, a proliferação e diferenciação dos condrócitos da placa de crescimento nos ossos longos (OICHI et al., 2020; HUTCHINGS et al., 2020). A função dos condrócitos na placa de crescimento é altamente regulada por uma série de fatores sistêmicos e locais, como o hormônio de crescimento, os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), e os Wnts. Como também é regulada pelos fatores transcricionais como o RUNX2 (OICHI et al., 2020).

Ademais, um dos fatores transcricionais, o *Osterix/Sp7* (*Osx*), é fundamental para a ossificação endocondral, processo biológico essencial para o desenvolvimento do esqueleto em mamíferos, e responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos longos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; HUTCHINGS et al., 2020). Desta forma, o *Osx*, juntamente com os outros fatores transcricionais (RUNX2 e *Dlx5*) podem ter estimulado vias de sinalização, como a *Wnt*, envolvendo a diferenciação osteogênica e condrogênica das CTMs transplantadas, e conseqüentemente estimulado o crescimento longitudinal dos fêmures dos camundongos *oim* tratados.

Outro parâmetro avaliado nos dois bioensaios para comparação entre as CTMs foi a expressão das cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 1(I)$ do colágeno tipo I. Como já

mencionado previamente neste trabalho, os camundongos *oim*, possuem mutação de deleção sobre o gene COL1A2, responsável pela expressão da cadeia $\alpha 1(I)$ do colágeno tipo I. Desta forma, animais heterozigotos apresentam redução da quantidade normal de colágeno heterotrimérico e aumento de colágeno anormal homotrimérico, composto apenas por cadeias $\alpha 1(I)$ (CHIPMAN, et al., 1993; CARRIERO, et al., 2014; LI, et al.; 2016). Portanto, após os 45 dias de ensaio, os músculos quadríceps dos animais foram retirados e digeridos para obtenção das proteínas totais, e as quantificações das cadeias COL1A1 e COL1A2 foram realizadas por ELISA. Resultados do primeiro e segundo ensaio mostraram aumento significativo da concentração da expressão proteica da cadeia $\alpha 1(I)$ em ng/mL do grupo tratado com as CTM-MO. No primeiro ensaio as CTM-MO expressaram mais COL1A1 ($19,92 \pm 1,32$ ng/mL) em relação ao grupo controle negativo ($14,38 \pm 3,38$ ng/mL) e ao grupo tratado com as CTM-TA ($13,38 \pm 1,42$ ng/mL), sendo significativo em comparação a este último ($P < 0,05$). Além disso, no segundo ensaio esse aumento chegou a representar quase o dobro da concentração dos demais grupos: $40,64 \pm 15,94$ ng/mL para as CTM-MO; $20,95 \pm 8,83$ ng/mL para as CTM-TA; $23,73 \pm 8,77$ ng/mL para o controle negativo; e $22,42 \pm 7,40$ ng/mL para o controle positivo. A análise estatística mostrou que a expressão do COL1A1 do grupo das CTM-MO foi significativamente mais alta do que nos grupos das CTM-TA e do controle positivo.

Os mecanismos de reparo tecidual promovidos pelas CTMs ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, um papel pleitrópico destas células é bastante descrito na literatura. WANG e colaboradores (2011) e STRIOGA e colaboradores (2012) reuniram, em seus trabalhos, evidências que demonstram os múltiplos papéis exercidos por estas células durante o processo de reparação tecidual. Um deles é a habilidade que elas possuem de exercer suas funções reparativas através de efeitos parácrinos, secretando fatores solúveis que são cruciais para a sobrevivência e proliferação celular. Estes fatores influenciam as células adjacentes, regulando a renovação celular ou recrutando moléculas que atuarão no reparo do tecido debilitado (WANG et al., 2011; STRIOGA et al., 2012). O aumento da expressão da cadeia COL1A1 promovido, de forma significativa, pelas CTM-MO pode ser explicado por esta propriedade de modular o microambiente para o reparo tecidual que as CTMs possuem. A hipótese é que as CTM-MO injetadas localmente não se diferenciaram, ou pouco se diferenciaram, e

majoritariamente exerceram sua atividade parácrina recrutando células hospedeiras e promovendo a proliferação celular endógena para o processo de reparação óssea. A função parácrina das CTM-MO também já foi evidenciada por LI, F. e colaboradores (2010) durante a formação de osso novo em fêmures de camundongos *oim*.

Outra propriedade bastante importante das CTMs no processo de reparação tecidual é a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares, de acordo com as sinalizações autócrinas ou que o próprio ambiente proporciona (WANG et al., 2011; STRIOGA et al., 2012). Esta propriedade foi observada na expressão da cadeia $\alpha 1$ (I) pelas CTM-TA, durante o primeiro ensaio de comparação entre as células. Embora os valores expressos não apresentem diferenças significativas entre os grupos, é evidente o aumento da concentração desta subunidade pelas CTM-TA ($101,0 \pm 20,84$ ng/mL) em relação às CTM-MO ($71,64 \pm 13,27$ ng/mL) e ao controle negativo ($57,87 \pm 11,76$ ng/mL).

Uma vez que os camundongos *oim* heterozigotos apresentam mutação no gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ (I) do colágeno tipo I, um aumento na expressão desta cadeia implica, possivelmente, na diferenciação promovida pelas CTM-TA em osteoblastos maduros que secretam colágeno estruturalmente normal. Esta capacidade de diferenciação osteogênica no local de enxertamento também já foi descrita por LI, F. e colaboradores (2010), PAULEY e colaboradores (2014) e SINDER e colaboradores (2019), utilizando o mesmo modelo murino para a OI, o camundongo *oim*, porém aplicando localmente CTMs provenientes da medula óssea.

Os resultados obtidos nos testes biomecânicos sobre os fêmures dos camundongos *oim* heterozigotos pós tratamento, corroboraram ou intensificam a hipótese de diferenciação local das CTM-TA. A avaliação biomecânica dos ossos dos camundongos *oim*, aqui realizada pelo teste de flexão de três pontos, é um dos principais parâmetros da melhora fenotípica da OI em modelo murino. Por meio deste parâmetro é possível avaliar as propriedades biomecânicas pós tratamento que estão diretamente relacionadas à deficiência do colágeno tipo I quantitativa e qualitativamente, como a flexibilidade e rigidez dos ossos, além de avaliar a melhora da expressão fenotípica mais aparente em pacientes com OI, a fragilidade óssea.

No primeiro teste de flexão de três pontos pudemos observar que as CTM-TA apresentaram resultados positivos em relação à melhora da fragilidade óssea nos parâmetros de flexibilidade, expresso pela extensão da flexão até a fratura, com $P < 0,05$ na comparação entre CTM-TA *versus* controle negativo; e na resistência do osso, expressa pelo tempo que os ossos resistiram à carga aplicada, até o momento da fratura, com $P < 0,05$ na comparação entre as CTM-TA e o controle negativo. No segundo ensaio, as CTM-TA, novamente, mostraram resultados significativos ($P < 0,05$) nos mesmos parâmetros anteriores sobre o controle negativo. E embora, as médias obtidas pelas CTM-TA ainda estejam abaixo das médias obtidas pelos camundongos normais, coletivamente, os resultados do teste biomecânico indicam uma melhora fenotípica da qualidade óssea no modelo *oim*.

O colágeno homotrimérico, constituído por apenas cadeias $\alpha 1$ (I), presente neste modelo murino, é caracterizado por apresentar uma estrutura fracamente compactada, devido ao empacotamento irregular da proteína, e pela presença de maior espaçamento entre as fibras do colágeno em relação à estrutura do heterotrímero (LI, et al., 2016). Além disso, os ossos de *oim* possuem cristais de hidroxiapatita pequenos e desorganizados, que possivelmente impedem a sua fusão normal em uma estrutura contígua (CARRIERO, et al., 2014). Desta forma, a distribuição desorganizada da mineralização dentro das fibras do colágeno, principalmente, por esses espaços mais largos entre as fibras, pode tornar a estrutura óssea mais fraca, comprometendo a qualidade biomecânica do tecido (CARRIERO, et al., 2014; LI, et al., 2016). Entretanto, como o camundongo *oim* heterozigoto apresenta tanto colágeno homotrimérico quanto o heterotrimérico, diferentes mecanismos de mineralização são iniciados por estas moléculas e são refletidos pelas variações na rigidez ao longo das fibras (LI, et al., 2016). Logo a coexistência do empacotamento de colágeno normal e anormal no heterozigoto reduz a sua plasticidade e a resistência óssea, porém ajuda a evitar as fraturas espontâneas, sendo um modelo alvo para a terapia celular (CARRIERO, et al., 2014).

Neste sentido, a aplicação das CTM-TA, neste trabalho, oferece um tratamento viável para melhora da qualidade óssea neste modelo animal, ao entregar células saudáveis ao tecido ósseo afetado, que possivelmente, se diferenciaram em osteoblastos maduros e funcionais, e produziram colágeno

normal heterotrimérico. Este colágeno, por sua vez, auxiliou na restauração da estrutura lamelar, melhorando aspectos de resistência, elasticidade e rigidez. Esta capacidade restaurativa que as CTMs possuem estão relacionadas às suas propriedades fundamentais, de estimulação parácrina e autócrina de proliferação e diferenciação celular (WANG et al., 2011; STRIOGA et al., 2012). Em ensaios com CTMs provenientes de outros tecidos, alguns autores também visualizaram melhoras nas propriedades biomecânicas nos ossos de camundongos *oim*, provenientes de atividades parácrinas e/ou da diferenciação osteogênica (LI, F. et al., 2010; RANZONI et al., 2016; SINDER et al., 2019).

Embora não haja evidências na literatura sobre a ação das CTM-TA sobre o reparo ósseo em modelos de OI, ela vem sendo bastante estudada como abordagem terapêutica para tratamento da osteoporose (HU et al., 2018). A osteoporose, assim como a OI, é caracterizada, principalmente, pela fragilidade óssea, porém causada pela redução drástica da diferenciação dos osteoblastos durante o processo de envelhecimento natural da medula óssea (HU et al., 2018). Em ensaios com modelos animais para a osteoporose, alguns autores descreveram que as CTM-TA foram capazes de melhorar a qualidade trabecular, induzir o aumento de marcadores moleculares de *turnover* ósseo, promover osteogênese *in vivo*, aumentar a densidade mineral óssea e formar osso novo (MIRSAIDI et al., 2014; YE et al., 2014).

Diante destas evidências fica cada vez mais clara a potencialidade das CTM-TA como fonte celular para tratamento não apenas da OI, mas também para outras desordens ósseas. Neste sentido, e baseando-se nos resultados obtidos nos dois bioensaios para comparação entre as CTMs, decidimos adotar as CTM-TA como fonte para o transplante celular associado à eletrotransferência do DNA plasmidial contendo o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) no bioensaio de avaliação pré-clínica do tratamento da OI tipo I em modelo murino.

O hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH) vem sendo estudado como abordagem farmacológica para o tratamento de OI devido ao seu efeito anabólico no aumento da DMO e no crescimento linear de pacientes portadores de OI (ANTONIAZZI et al., 1996; 2010). Assim como sua ação na melhora da qualidade óssea em camundongos *oim* (KING et al., 2005). O hormônio de crescimento (GH) possui efeitos múltiplos sobre o crescimento ósseo, promovendo o aumento da proliferação de células osteogênicas e condrogênicas

e, conseqüentemente, aumentando a deposição de colágeno tipo I, que promove o crescimento ósseo (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019).

Em ensaio pré-clínico, realizado recentemente por nosso grupo de pesquisa, a eletrotransferência do gene do mGH se mostrou bastante promissora para a melhora da qualidade óssea de animais modelos para a OI, o camundongo *oim* (JESUS, 2020). Em seu trabalho, JESUS (2020) mostrou que a terapia gênica com mGH promoveu melhora em parâmetros quantitativos e qualitativos das propriedades biomecânicas nos ossos de camundongos *oim*. Após tratamento, os fêmures dos animais tornaram-se mais flexíveis e menos quebradiços. E os resultados histomorfométricos, mostraram que o mGH estimulou o aumento da espessura e da celularidade da ossificação endocondral nas tíbias, além de promover o aumento do volume trabecular, indicando, desta forma, que houve formação de osso novo nos animais tratados, promovidos pela ação da expressão gênica do hormônio.

Neste sentido, neste trabalho, avaliamos a ação das CTM-TA associadas à eletroporação do mGH sobre a melhora da qualidade óssea dos camundongos *oim*.

No bioensaio de 60 dias para avaliação pré-clínica da associação entre a terapia gênica, com a eletroporação do gene *mGH*, e a terapia celular, pela infusão das CTM-TA, pudemos observar que esta abordagem terapêutica foi positiva sobre a melhora do fenótipo da OI no modelo murino utilizado. Em relação aos parâmetros de crescimento, foi observado que o grupo tratado com as CTM-TA associadas à eletroporação do gDNA mGH (CTM-TA + DNA) apresentou resultados significativos ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo na variação do crescimento longitudinal (corpo e cauda). Com relação à este parâmetro, assim como nos bioensaios de comparação entre as CTMs, podemos observar a atuação parácrina das CTM-TA estimulando, agora em conjunto com mGH, a proliferação celular de condrócitos e osteoblastos na placa de crescimento, e conseqüentemente, promovendo o crescimento ósseo nos camundongos *oim* (OTSURU et al., 2017; OICHI et al., 2020). Assim como a ação da superexpressão do mGH, juntamente com os outros fatores sistêmicos e transcricionais, na função dos condrócitos sobre a placa de crescimento, e na estimulação da diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM-TA (BOLAMPERTI, et al., 2019; OICHI et al., 2020; UTCHINGS et al., 2020).

Foi também verificado que o crescimento longitudinal (corpo e cauda) do grupo CTM-TA + DNA também foi significativo ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos. Além disso, este crescimento longitudinal dos animais foi acompanhado pelo aumento de peso, sendo este incremento significativo ($P < 0,05$) em relação ao grupo CTM-TA + DNA *versus* o controle positivo. Estes resultados, em conjunto, indicam, possivelmente, que a velocidade no crescimento dos animais tratados com ambas as terapias foi acelerada em relação aos demais grupos, inclusive em relação aos animais normais, *wild type*.

Sobre os resultados obtidos no teste de flexão de três pontos, pudemos observar que a associação entre as terapias gênica *in vivo* e celular foi significativa para todos os parâmetros analisados quanto à melhora da qualidade óssea dos camundongos *oim* heterozigotos. O grupo CTM-TA + DNA apresentou resultados significativos ($P < 0,05$) em todos os parâmetros (carga máxima, extensão da flexão dos fêmures até a fratura, e tempo até a fratura) em relação ao grupo controle negativo. Além disso, observamos a proximidade dos valores médios obtidos pelo grupo CTM-TA + DNA em relação ao controle positivo: i) extensão da flexão $0,283 \pm 0,06$ mm para CTM-TA + DNA *versus* $0,290 \pm 0,03$ mm para controle positivo; ii) tempo até a fratura $17,19 \pm 3,73$ s para CTM-TA + DNA *versus* $17,74 \pm 1,79$ s para controle positivo. Estes resultados, em conjunto, indicam que os fêmures dos camundongos *oim* do grupo CTM-TA + DNA tornaram-se mais flexíveis, resistentes e menos quebradiços, alcançando valores médios de animais selvagens.

A melhora qualitativa das propriedades biomecânicas dos ossos destes animais foi acompanhada pela melhora quantitativa da expressão local da subunidade $\alpha 1(I)$ do colágeno tipo I, indicando que possivelmente houve melhora, também, da quantidade de colágeno heterotrimérico normal. Os resultados do ELISA para a cadeia COL1A2 mostraram que o grupo CTM-TA + DNA expressou esta cadeia significativamente ($P < 0,05$) mais do que o controle negativo e o grupo tratado apenas com a eletroporação do gene do mGH (DNA). Além disso, assim como no teste biomecânico, os valores médios obtidos pelo grupo CTM-TA + DNA ($119,30 \pm 23,03$ ng/mL) se assemelharam ao controle positivo, composto por animais selvagens ($106,55 \pm 24,67$ ng/mL).

Entretanto, quando avaliamos a expressão do plasmídeo contendo o gene *mGH* através dos ELISAs de mGH e mIGF-I, pudemos observar que após os 60 dias de tratamento, não houve diferenças significativas nos níveis séricos

desses dois hmonios entre os grupos, indicando que a meia-vida do plasmdeo *in vivo* curta. Em bioensaio de apenas 3 dias com camundongos *oim* heterozigotos, JESUS (2020) mostrou uma superexpresso do mGH aps a eletroporao do gene *mGH* na musculatura esqueltica deste modelo animal, comprovando a eficincia desta metodologia, uma vez que o camundongo *oim* no apresenta disfunes no eixo GH/IGF-I.

O hrmonio de crescimento (GH) amplamente conhecido por exercer um importante papel no crescimento linear de quase todos os tecidos do corpo, na multiplico e diferenciao especfica de algumas clulas, e na manuteno da composio crporea e do metabolismo (GUYTON & HALL, 2011; OLARESCU et al., 2019). Contudo, nos ltimos anos, o GH tambm vem ganhando outras funes importantes, devido ao seu possvel papel na modulao da diferenciao das clulas-tronco mesenquimais (CTMs), uma vez que estas clulas expressam receptores de GH (BOLAMPERTI et al., 2019).

Em CTMs derivadas da medula ssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) tem sido demonstrado que o GH induz uma inibio na diferenciao adipognica e favorece a diferenciao osteognica (BOLAMPERTI et al., 2019). Em estudo realizado por OLARESCU e colaboradores (2015) foi observado que a ausncia de um receptor de GH em CTM-TA extradas de um camundongo *knockout* para este receptor (GHRKO), aumenta a diferenciao adipognica por estas clulas, assim como aumenta os nveis de genes relacionados adipognese. Por outro lado, em CTM-TA isoladas de um camundongo que expressa GH bovino (bGH) foram observados baixos nveis de genes adipognicos, menor acmulo de lipdeos e aumento na transcrio do gene *AXIN2*, que um alvo da sinalizao Wnt, responsvel por promover a diferenciao osteognica (OLARESCU et al., 2015). Alm disso, em outro estudo realizado por BOLAMPERTI e colaboradores (2018) foi confirmado que o GH inibiu a diferenciao adipognica em CTM-MO, e promoveu aumento dos fatores transcripcionais osteognicos, como o *Osterix/Sp7* (*Osx*) e a osteoprotegerina, alm de aumentar os ativadores da sinalizao Wnt.

Em resumo, o GH apresenta um papel modulador no destino das CTMs quanto inibio da diferenciao adipognica, por meio da ativao da via de sinalizao Wnt, alm de promover a diferenciao osteognica destas clulas (BOLAMPERTI et al., 2019).

O fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) também apresenta um importante papel na estimulação da proliferação e atividade dos osteoblastos (BOUILLON, 1991). O IGF-I é produzido e liberado, principalmente, pelo fígado, a partir da estimulação do GH, e tem se mostrado importante também na modulação da diferenciação osteogênica de CTMs (HUTCHINGS et al., 2020). Assim como a via de sinalização Wnt, a via de sinalização do IGF-I também pode ser regulada pelos fatores de transcrição RUNX2 e Osterix/Sp7 (Osx), principalmente. O IGF-I já foi descrito, juntamente com a BMP2, como fator importante no processo de regulação positiva osteogênica do fator Osx (HUTCHINGS et al., 2020).

Desta forma, possivelmente, podemos supor que a superexpressão do GH promovida pela eletroporação do gene *mGH* modulou a diferenciação osteogênica das CTM-TA infundidas localmente, além de estimular a regulação positiva de fatores de transcrição como a Osx a partir da estimulação da produção de IGF-I. Da mesma forma, as CTM-TA exerceram sua atividade no processo de reparação óssea através da estimulação parácrina de proliferação e diferenciação celular, e através das sinalizações reguladas pelos fatores transcricionais promovidas pelo ambiente onde foram inseridas.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos mostrar, pela primeira vez, que a eletroporação do gene do mGH associada ao transplante local de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo melhorou as qualidades fenotípicas do camundongo modelo para a osteogênese imperfeita do tipo I.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados inéditos obtidos neste trabalho podemos concluir que a terapia gênica *in vivo* associada ao transplante celular de células-tronco mesenquimais (CTMs) mostrou ser uma abordagem promissora para o tratamento de osteogênese imperfeita (OI), em modelo murino. O transplante celular local de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) associado à eletrotransferência muscular do plasmídeo pUC-UBI-mGH melhorou as qualidades fenotípicas de camundongos *oim* heterozigotos, modelo murino para OI do tipo I.

Nos bioensaios para comparação entre as CTMs provenientes da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA), quanto à melhora do fenótipo da OI em modelo murino, embora ambas as células tenham desempenhado suas atividades no processo de reparação tecidual, as CTM-TA mostraram-se mais eficazes na melhora das propriedades biomecânicas dos ossos dos camundongos *oim* heterozigotos. As CTM-TA indicaram possível ação parácrina no recrutamento, proliferação e diferenciação de células endógenas durante o crescimento ósseo, expressão da subunidade $\alpha 1$ do colágeno tipo I, e da deposição de colágeno sobre os fêmures, melhorando sua flexibilidade e resistência. Além disso, possivelmente, estas células se diferenciaram em osteoblastos expressando colágeno heterotrimérico normal, melhorando as características estruturais dos fêmures dos camundongos *oim*.

Consequentemente a utilização desta linhagem celular associada à eletroporação do gene *mGH* mostrou-se mais eficiente sobre a melhora fenotípica da doença. A ação moduladora que o hormônio de crescimento (GH) e os fatores de crescimento, como o IGF-I, exercem sobre a diferenciação osteogênica, possivelmente, foram os responsáveis pelos resultados significativos em todos os parâmetros avaliados e pela proximidade dos valores médios com os animais selvagens. A superexpressão do mGH pode ter estimulado vias de sinalização de diferenciação osteogênica nas CTM-TA, promovendo assim, a expressão de colágeno heterotrimérico normal por osteoblastos sádios, e sua deposição sobre a matriz óssea. Esta maior expressão de colágeno heterotrimérico é essencial para

melhorar os aspectos relacionados à fragilidade óssea enfrentada pelos pacientes de OI.

Mais estudos e análises precisam, ainda, serem realizados para corroborar as hipóteses aqui levantadas, além de oferecerem melhor compreensão sobre o papel do GH na modulação e no destino das CTMs quanto a sua diferenciação. A curto prazo, ensaios futuros utilizando camundongos *oim* homozigotos, além de análises histológicas serão essenciais para ajudar a solucionar essas questões.

Diante dos objetivos propostos neste trabalho podemos, portanto, inferir, que a eletroporação do gene do mGH associada ao transplante local de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo melhoraram as qualidades fenotípicas do camundongo modelo para a osteogênese imperfeita do tipo I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOU, L.V. Isolation of plasmid DNA from bacteria. **Methods Enzymol.** v.529, p. 135-142, 2013.

ANOI. Associação Nacional de Osteogênese Imperfeita. **Centros de Referência em Osteogênese Imperfeita**. Acesso em 22 de novembro de 2020. Disponível em: <<http://www.anoi.com.br/p/crois.html>>.

ANTONIAZZI, F.; BERTOLDO, F.; MOTTES, M.; VALLI, M.; SIRPRESI, S.; ZAMBONI, G.; VALENTINI, R.; TATO, L. Growth hormone treatment in osteogenesis imperfecta with quantitative defect of type I collagen synthesis. **J. Pediatr.** v.129, p. 432-439, 1996.

ANTONIAZZI, F.; MONTI, E.; VENTURI, G.; FRANCESCHI, R.; DORO, F.; GATTI, D.; ZAMBONI, G.; TATO, L. GH in combination with bisphosphonate treatment in osteogenesis imperfecta. **Eur. J. Endocrinol.** v.163, p. 479-487, 2010.

BOLAMPERTI, S.; GUIDOBONO, F.; RUBINACCI, A.; VILLA, I. The role of growth hormone in mesenchymal stem cell commitment. **Int. J. Mol. Sci.** v.20, p. 1-13, 2019.

BOLAMPERTI, S.; SIGNO, M.; SPINELLO, A.; MORO, G.; FRASCHINI, G.; GUIDOBONO, F.; RUBINACCI, A.; VILLA, I. GH prevents adipogenic differentiation of mesenchymal stromal stem cells derived from human trabecular bone via canonical Wnt signaling. **Bone** v.112, p. 136-144, 2018.

BOUILLON, R. Growth hormone and bone. **Horm. Res.** v.36, p. 49-55, 1991.

BOXALL, S.A.; JONES, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. **Stem Cells Int.** v.2012, p.1-12, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 110, de 10 de março de 2010. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Hipopituitarismo**. Acesso em 22 de novembro de 2020. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0110_10_03_2010_rep.html>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1306, de 22 de novembro de 2013. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteogênese Imperfeita.**

Acesso em 24 de outubro de 2020. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/03/pcdt-osteogenese-imperfeita-livro-2013.pdf>>.

CAMACHO, N.P.; HOU L.; TOLEDANO, T.R.; ILG, W.A.; BRAYTON, C.F.; RAGGIO, C.L.; ROOT, C.L.; BOSKEY, A.L.; The material basis for reduced mechanical properties in oim mice bones. **J. Bone Miner Res.** v.14(2), p. 264-72, 1999.

CARDINAL, M.; TYS, J.; ROELS, T.; LAFONT, S.; OMINSKY, M.S.; DEVOGELAER, J-P.; CHAPPARD, D.; MABILLEAU, G.; AMMANN, P.; NYSSSEN-BEHETS, C.; MANICOURT, D.H. Sclerostin antibody reduces long bone fractures in the oim/oim model of osteogenesis imperfecta. **Bone.** v.124, p. 137-147, 2019.

CARRIERO, A.; ZIMMERMANN, E. A.; PALUSZNY, A.; TANG, S. Y.; BALE, H.; BUSSE, B.; ALLISTON, T.; KAZAKIA, G.; RITCHIE, R. O.; SHEFELBINE, S. J. How tough is brittle bone? Investigating osteogenesis imperfecta in mouse bone. **J. Bone Miner. Res.** v. 26, p. 1392-1401, 2014.

CECCHI, C.R.; HIGUTI, E.; LIMA, E.R.; VIEIRA, D.P.; SQUAIR, P.L.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P. Efficient non-invasive plasmid-DNA administration into tibialis cranialis muscle of "little" mice. **Curr. Mol. Med.** v. 17, p. 230-235, 2017.

CECCHI, C.R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, N.A.J.; LIMA, E.R.; JAKOBSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; GISSEL, H.; AAGAARD, L.; JENSEN, T.G.; JORGE, A.A.L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C.N. A novel homologous model for gene therapy of dwarfism by non-viral transfer of the mouse growth hormone gene into immunocompetent dwarf mice. **Curr. Gene Ther.** v. 14, p. 44-51, 2014.

CECCHI, C.R. **Obtenção de um modelo homólogo de terapia gênica mediante administração de um plasmídeo com o gene do hormônio de crescimento murino em camundongos anões imunocompetentes (Tese).** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.

CERVIA, L.D.; YUAN, F. Current progress in electrotransfection as a nonviral method for gene delivery. **Mol. Pharm.** v.15, p. 3617-3624, 2018.

CHAMBERLAIN, J.R.; DEYLE, D.R.; SCHWARZE, U.; WANG, P-R.; HIRATA, R.K.; YI, L.; BYERS, P.H.; RUSSELL, D.W. Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. **Mol. Ther.** v.16, p.187-193, 2008.

CHAMBERLAIN, J.R.; SCHWARZE, U.; WANG, P-R.; HIRATA, R.K.; HANKENSON, K.D.; PACE, J.M.; UNDERWOOD, R.A.; SONG, K.M.; SUSSMAN, M.; BYERS, P.H.; RUSSELL, D.W. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. **Science**. v. 303, p.1198-1201, 2004.

CHEN, Y.; WANG, G.; ZENG, L. Adipose tissue or bone marrow, store for purchasing mesenchymal stem cells? **Circ. J.** v.75, p. 2060-2061, 2011.

CHIPMAN, S.D.; SWEET, H.O.; MCBRIDE JR, D.J.; DAVISSON, M.T.; MARKS JR, S.C.; SHULDINER, A.R.; WENSTRUP, R.J.; ROWE, D.W.; SHAPIRO, J.R. Defective proc α 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfect. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 90, p.1701-1705, 1993.

DEYLE, D. R.; KHAN, I.F.; REN, G.; WANG, P-R.; KHO, J.; SCHWARZE, U.; RUSSELL, D.W. Normal collagen and bone production by gene-targeted human osteogenesis imperfecta iPSCs. **Mol. Ther.** v.20, p. 204-213, 2011.

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

ENGLISH, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. **Immunol. Cell. Biol.** v.91, p. 19-26, 2013.

FAVRE, D.; CHEREL, Y.; PROVOST, N.; BLOUIN, V.; FERRY, N.; MOULLIER, P.; SALVETTI, A. Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. **Gene Ther.** v. 7, p. 1417-1420, 2000.

FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis Imperfecta. **The Lancet** v. 387, p. 1657-1671, 2016.

FRANÇOIS, S.; BENSIDHOUM, M.; MOUSEDINE, M.; MAZURIER, C.; ALLENET, B.; SEMONT, A.; FRICK, J.; SACHÉ, A.; BOUCHET, S.; THIERRY, D.; GOURMELON, P.; GORIN, NC.; CHAPEL, A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. **Stem Cells**. v.24(4), p. 1020-1029, 2006.

FRIEDENSTAIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guine-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.** v.3, p. 393-403, 1970.

GINN, S.L.; AMAYA, A.K.; ALEXANDER, I.E.; EDELSTEIN, M.; ABEDI, M.R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. **J. Gene Med.** v.20, p.1-16, 2018.

GÖTHERSTRÖM, C.; WALTHER-JALLOW, L. Stem cell therapy as a treatment for osteogenesis imperfecta. **Curr. Osteoporos. Rep.** v.18, p. 337-343, 2020.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. Cap.75 – **Hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo**, p. 941-953, 12º ed.: Elsevier, Rio de Janeiro, 2011.

HERBERG, S.; KONDRIKOVA, G.; HUSSEIN, K.A.; PERIYASAMY-THANDAVAN, S.; JOHNSON, M.H.; ELSALANTY, M.E.; SHI, X.; HAMRICK, M.W.; ISALES, C.M.; HILL, W.D. Total body irradiation is permissive for mesenchymal stem cell-mediated new bone formation following local transplantation. **Tissue Eng. Part A.** v.20(23-24), p. 3212-3227, 2014.

HIGUTI, E.; CECCHI C.R.; OLIVEIRA N.A.J.; LIMA E.R.; VIEIRA D.P.; AAGAARD, L.; JENSEN, T.G.; JORGE A.A.L.; BARTOLINI P.; PERONI, C.N. Partial correction of the dwarf phenotype by non-viral transfer of the growth hormone gene in mice: treatment age is critical. **Growth Horm. & IGF Res.** v. 26, p. 1-7, 2016.

HIGUTI E.; CECCHI C.R.; OLIVEIRA N.A.J.; VIEIRA D.P.; JENSEN T.G.; JORGE, A.A.L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C.N. Growth responses following a single intramuscular hGH plasmid administration compared to daily injections of hGH in dwarf mice. **Curr. Gene Ther.** v. 12, p. 437-443, 2012.

HIGUTI, E. **Correção fenotípica do nanismo avaliada por diferentes parâmetros de crescimento após administração de DNA plasmidial em modelo animal de deficiência isolada do hormônio de crescimento (Tese).** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2016.

HORWITZ, E.M.; GORDON, P.L.; KOO, W.W.K.; MARX, J.C.; NEEL, M.; MCNALL, R.Y.; MUUL, L.; HOFMANN, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 99, p. 8932-8937, 2002.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; FITZPATRICK, L.A.; KOO, W.W.K.; GORDON, P.L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J.C.; PYERITZ, R.E.; BRENNER, M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat. Med.** v. 5, p. 309-313, 1999.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; GORDON, P.L.; KOO, W.W.K.; FITZPATRICK, L.A.; NEEL, M.; MCCARVILLE, M.E.; ORCHARD, P.J.; PYERITZ, R.E.; BRENNER, M.K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. **Blood.** v. 97, p. 1227-1231, 2001.

HOWARD, S. R.; BUTLER, G. E. An analysis of the clinical and cost effectiveness of growth hormone replacement therapy before and during puberty: should we increase the dose? **Horm. Res. Pediatr.**, v. 79, p. 75-82, 2013.

HU L.; YIN, C.; ZHAO, F.; ALI, A.; MA, J.; QIAN, A. Mesenchymal stem cells: cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, p. 1-19, 2018.

HUTCHINGS, G.; MONCRIEFF, L.; DOMPE, C.; JANOWICZ, K.; SIBIAK, R.; BRYJA, A.; JANKOWSKI, M.; MOZDZIAK, P.; BUKOWSKA, D.; ANTOSIK, P.; SHIBLI, J.A.; DYSZKIEWICZ-KONWIŃSKA, M.; BRUSKA, M.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA-KEMPISTY, H. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials. **J. Clin. Med.** v.9, p. 1-27, 2020.

JELIN, A.C.; O'HARE, E.; BLAKEMORE, K.; JELIN, E.B.; VALLE, D.; HOOVER-FONG, J. Skeletal dysplasias: growing therapy for growing bones. **Front. Pharmacol.** v.8, p. 1-6, 2017.

JESUS, G.P.P. de. **Avaliação do efeito da terapia gênica por eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento murino em modelo animal de osteogênese imperfeita (Tese)**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Cap.5 – **Tecido conjuntivo**, p. 99-106; **Cap. 8 – Tecido Ósseo** p. 132-148, 12ª ed.: Guanabara Koogna, Rio de Janeiro, 2013.

KANETO, C.M. **Análise da expressão gênica durante a diferenciação osteogênica de células mesenquimais estromais de medula óssea de pacientes portadores de osteogênese imperfeita (Tese)**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

KANG, H.; ARYAL, A. C. S.; MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. **Trans. Res.** v. 181, p. 27-48, 2017.

KAWAGUCHI, H.; SOEJIMA, T.; ISHIBASHI, N.; AKIBA, T.; HASEGAWA, M.; ISOBE, K.; ITO, H.; IMAI, M.; EJIMA, Y.; HATA, M.; SASAI, K.; SHIMODA, E.; OGUCHI, M.; AKIMOTO, T. National survey on total-body irradiation prior to reduced-intensity stem cell transplantation in Japan: The Japanese Radiation Oncology Study Group. **J. Radiat. Res.** v.60, p. 579-585, 2019.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.** v.24, p. 1294-1301, 2006.

KING, D.; JARJOURA, D.; MCEWEN, H. A.; ASKEW, M. J. Growth hormone injections improve bone quality in a mouse model of osteogenesis imperfecta. **J. Bone Miner. Res.** v. 20, p. 987-993, 2005.

LASMAR, R.P.; VIEIRA, J.S.; MARQUES, R.P.; MARQUES, J.N.C. Doença dos ossos frágeis: relato de caso. **Rev. Bras. Ortop.** v. 48, p. 286-289, 2013.

LEE, L.R.; PEACOCK, L.; GINN, S.L.; CANTRILL, L.C.; CHENG, T.L.; LITTLE, D.G.; MUNNS, C.F.; SCHINDELER, A. Bone marrow transplantation for treatment of the Col1a2+/G610C osteogenesis imperfecta mouse model. **Calcif. Tissue Int.**, v. 104(4), p. 426–436, 2018.

LI, F.; WANG, X.; NIYIBIZI, C. Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta. **Bone.** v. 47, p. 546-555, 2010.

LI, H.; JIANG, X.; DELANEY, J.; FRANCESCHETTI, T.; BILIC-CURCIC, I.; KALINOVSKY, J.; LORENZO, J.A.; GRCEVIC, D.; ROWE, D.W.; KALAJZIC, I. Immature osteoblast lineage cells increase osteoclastogenesis in osteogenesis imperfecta murine. **Am. J. Pathol.** v.176, p. 2405-2413, 2010.

LI, T.; CHANG, SW.; RODRIGUEZ-FLOREZ, N.; BUEHLER, M. J.; SHEFELBINE, S.; DAO, M.; ZENG, K. Studies of chain substitution caused sub-fibril level differences in stiffness and ultrastructure of wildtype and *oim/oim* collagen fibers using multifrequency-AFM and molecular modeling. **Biomaterials**. v. 107, p. 15-22, 2016.

LINDEN, R. Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be. **Estud. Av.** v. 24, p. 1-39, 2010.

LIMA, E.R.; CECCHI, C.R.; HIGUTI, E.; de JESUS, G.P.P.; GOMES, A.M.; ZACARIAS, E.A.; BARTOLINI, P.; PERONI, C.N. Optimization of mouse growth hormone plasmid DNA electrotransfer into tibialis cranialis muscle of “little” mice. **Molecules**. v.25, p. 1-9, 2020.

LIMA, M.A.F.D.; HOROVITZ, D.D.G. Contradições das políticas públicas voltadas para doenças raras: o exemplo do Programa de Tratamento da Osteogênese Imperfeita no SUS. **Ciêñ. Saúde coletiva**. v.19, p. 475-480, 2014.

LIU, Y.; WU, J.; ZHU, Y.; HAN, J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. **Clin. Exp Med.** v. 14, p.13-24, 2012.

LUPU, F.; TERWILLIGER, J.D.; LEE, K.; SEGRE, G.V.; EFSTRATIADIS, A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. **Dev. Biol.** v.229, p. 141-162, 2001.

MAEDER, M.L.; GERSBACH, C.A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. **Mol. Ther.** v.24, p. 430-446, 2016.

MALAJOVICH, M.A.M. Biotecnologia. Cap.9 – **A engenharia genética**, p. 95-113, 2ª ed.: ISBN 978-85-921077-0-3, Rio de Janeiro, 2016.

MARINI, J.C; BORDENICK, S.; HEAVNER, G.; ROSE, S.; HINTZ,R.; ROSENFELD, R.; CHROUSOS, G.P. The growth hormone and somatomedin axis in short children with osteogenesis imperfecta. **J. Clin. Endocrinol Metab.** v.76, p. 251-259, 1993.

MARINI, J.; SMITH, SM. Osteogenesis Imperfecta. **Endotext**, p. 1-61, 2015.

MARINI, J.C.; FORLINO, A.; BÄCHINGER, H.P.; BISHOP, N.J.; BYERS, P.H.; PAEPE, A.D.; FASSIER, F.; FRATZL-ZELMAN, N.; KOZLOFF, K.M.; KRAKOW, D.; MONTPETIT, K.; SEMLER, O. Osteogenesis Imperfecta. **Nat. Rev. Dis. Primers**. v. 3, p. 1-19, 2017.

MAZINI, L.; ROCHETTE, L.; AMINE, M.; MALKA, G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). **Int. J. Mol. Sci.** v.20, p. 1-30, 2019.

MCBRIDE, D.J.; SHAPIRO, J.R. Confirmation of a G nucleotide deletion in the Cola-2 gene of mice with the osteogenesis imperfecta mutation. **Genomics.** v.20, p. 135-137, 1994.

MILLINGTON-WARD, S.; McMAHON, H.P.; FARRAR, G.J. Emerging therapeutic approaches for osteogenesis imperfecta. **Trends Mol. Med.** v.11, p. 299-305, 2005.

MIRSAIDI, A.; GENELIN, K.; VETSCH, J.R.; STANGER, S.; THEISS, F.; LINDTNER, R.A.; RECHENBERG, B.V.; BLAUTH, M.; MÜLLER, R.; KUHN, G.A.; BOSS, S.H.; EBNER, H.L.; RICHARDS, P.J. Therapeutic potential of adipose-derived stromal cells in age-related osteoporosis. **Biomaterials** v.35, p. 7326-7335, 2014.

MUZUMDAR, M.D.; TASIC, B.; MIYAMICHI, K.; LI, L.; LUO, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. **Genesis.** v.45, p. 593-605, 2007.

NAKANISHI, C.; NAGAYA, N.; OHNISHI, S.; YAMAHARA, K.; TAKABATAKE, S.; KONNO, T.; HAYASHI, K.; KAWASHIRI, M.A.; TSUBOKAWA, T.; YAMAGISHI, M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. **Circ. J.** v.75, p. 2260-2268, 2011.

OGAWA, K. Associação brasileira de osteogenesis imperfecta. **ABOI, 2013**. Acesso em Disponível em 22 de novembro de 2020. Disponível em: <http://www.senado.leg.br/comissoes/CE/AP/AP20130424_KatiaOgawa.pdf>.

OICHI, T.; OTSURU, S.; USAMI, Y.; ENOMOTO-IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M. Wnt signaling in chondroprogenitors during long bone development and growth. **Bone.** v.137, p. 1-6, 2020.

OLARESCU, N.C.; BERRYMAN, D.E.; HOUSEHOLDER, L.A.; LUBBERS, E.R.; LIST, E.O.; BENENCIA, F.; KOPCHICK, J.J.; BOLLERSLEV, J. GH action influences adipogenesis of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **J. Endocrinol.** v.226, p. 13-23, 2015.

OLARESCU, N.C.; GUNAWARDANE, K.; HANSEN, T.K.; MOLLER, N.; JORGENSEN, J.O.L. **Normal physiology of growth hormone in adults**. Endotext. Acesso em 22 de novembro de 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279056/>>. Última atualização 16 de outubro de 2019.

OLIVEIRA, N.A.J.; CECCHI, C.R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA J.E.; JENSEN T.G.; BARTOLINI P.; PERONI, C.N. Long-term human growth hormone expression and partial phenotypic correction by plasmid-based gene therapy in an animal model of isolated growth hormone deficiency. **J Gene Med**. v. 12, p. 580-585, 2010.

OTSURU, S.; DESBOURDES, L.; GUESS, A.J.; HOFMANN, T.J.; RELATION, T.; KAITO, T.; DOMINICI, M.; IWAMOTO, M.; HORWITZ, E.M. Extracellular vesicles released from mesenchymal stromal cells stimulate bone growth in osteogenesis imperfecta. **Cytotherapy**. v.20, p. 62-73, 2017.

OTSURU, S.; GORDON, P.L.; SHIMONO, K.; JETHVA, R.; MARINO, R.; PHILLIPS, C.L.; HOFMANN, T.J.; VERONESI, EL.; DOMINICI, M.; IWAMOTO, M.; HORWITZ, E.M. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSC impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. **Blood**. v. 120, p.1933-1941, 2012.

PACCINI, M.K.; GLANER, M.F. Densidade mineral óssea e absorptometria de raio-X de dupla energia. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum**. v.10, p. 92-99, 2008.

PASTERNAK, J.J. Genética Molecular Humana. Cap.13 – **Terapia gênica humana**, p.417-450, 1ªed.: Manole Ltda, São Paulo, 2002.

PAULEY, P.; MATTHEWS, B.G.; WANG, L.; DYMENT, N.A.; MATIC, I.; ROWE, D.W. Local transplantation is an effective method for cell delivery in the osteogenesis imperfecta murine model. **Int. Orthop**. v.38, p. 1955-1962, 2014.

PEDRONI, M. V. C. M. **Análise molecular e funcional dos genes formadores e reguladores do colágeno tipo I em pacientes com osteogênese imperfeita (Dissertação)**. Biblioteca Digital da UNICAMP. Campinas, SP, 2012.

PEREIRA, R.F.; O'HARA, M.D.; LAPTEV, A.V.; HALFORD, K.W.; POLLARD, M.D.; CLASS, R.; SIMON, D.; LIVEZEY, K.; PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 1142-1147, 1998.

PONOMARYOV, T.; PELED, A.; PETIT, I.; TAICHMAN, R.S.; HABLER, L.; SANDBANK, J.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; MAGERUS, A.; CARUZ, A.; FUJII, N.; NAGLER, A.; LAHAV, M.; SZYPER-KRAVITZ, M.; ZIPORI, D.; LAPIDOT, T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cells function. **J. Clin. Invest.** v.106(11), p. 1331-1339, 2000.

PRUCHNO, C.J.; COHN, D.H.; WALLIS, G.A.; WILLING, M.C.; STARMAN, B.J.; ZHANG, X.; BYERS, P.H. Osteogenesis imperfecta due to recurrent point mutations at CpG dinucleotides in the COL1A1 gene of type I collagen. **Hum. Genet.** v.87, p.33-40, 1991.

RANGEL, E.B.; GOMES, S.A.; DULCE, R.A.; PREMER, C.; RODRIGUES, C.O.; TAKEUCHI, R.M.K.; OSKOU EI, B.; CARVALHO, D.A.; RUIZ, P.; REISER, J.; HARE, J.M. C-kit⁺ cells isolation from developing kidneys are a novel population of stem cells with regenerative potential. **Stem Cells.** v.31, p. 1644-1656, 2013.

RANZONI, A.M.; CORCELLI, M.; HAU, K.L.; KERNS, J.G.; VANLEENE, M.; SHEFELBINE, S.; JONES, G.N.; MOSCHIDOU, D.; DALA-ALI, B.; GOODSHIP, A.E.; COPPI, P.; ARNETT, T.R.; GUILLOT, P.V. Counteracting bone fragility with human amniotic mesenchymal stem cells. **Sci. Rep.** v. 6, p. 1-11, 2016.

ROBBI, K.P.; FITZGERALD, J.C.; BARRY, F.; VISWANATHAN, S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. **Cytotherapy** v.21, p. 1-18, 2018.

ROHBAN, R.; PIEBER, T.R. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. **Stem Cells Int.** doi: 10.1155/2017/5173732 p. 1-16, 2017.

ROSSI, V.; LEE, B.; MAROM, R. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment. **Curr. Opin. Pediatr.** v.31, p. 708-715, 2019.

SABAN, J.; KING, D. PCR Genotyping of *oim* mutant mice. **BioTechniques**, v. 21, p. 190-192, 1996.

SABAN, J.; ZUSSMAN, M.A.; HAVEY, R.; PATWARDHAN, A.G.; SCHNEIDER, G.B.; KING, D. Heterozygous *oim* mice exhibit a mild form of osteogenesis imperfecta. **Bone.** v.19, p.575-579, 1996.

SAEED, H.; AHSAN, M.; SALEEM, Z.; IQTEDAR, M.; ISLAM, M.; DANISH, Z.; KHAN, A.M. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics – an update. **J. Biomed. Sci.** p.1-15, 2016.

SÁVIO-SILVA, C.; SOINSKI-SOUSA, P.E.; SIMPLÍCIO-FILHO, A.; BASTOS, R.M.C.; BEYERSTEDT, S.; RANGEL, E.B. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in a pre-clinical model of diabetic kidney disease and obesity. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, p. 1-22, 2021.

SHARMA, U.; CARRIQUE, L.; GOFF, S.V-L.; MARIANO, N.; GEORGES, R-N.; DELOLME, F.; KOIVUNEN, P.; MYLLYHARJU, J.; MOALI, C.; AGHAJARI, N.; HULMES, D.J.S. Structural basis of homo- and heterotrimerization of collagen I. **Nat. Commun.** v.8, p. 1-10, 2017.

SILLENCÉ, D.O.; SENN, A.; DANKS, D.M. Genetics heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **J. Med. Genet.** v. 16, p. 101-116, 1979.

SINDER, B.P.; NOVAK, S.; WEE, N.K.Y.; BASILE, M.; MAYE, P.; MATTHEWS, B.G.; KALAJZIC, I. Engraftment of skeletal progenitor cells by bone directed transplantation improves osteogenesis imperfecta murine bone phenotype. **Stem Cells.** v.38, p. 530-541, 2019.

SPENCER, E.M.; LIU, C.C.; SI, E.C.C.; HOWARD, G.A. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. **Bone.** v.12, p. 21-26, 1991.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells Dev.** v.21, p.2724-2752, 2012.

VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 43, p. 367-370, 1997.

VIDAL, M.A.; WALKER, N.J.; NAPOLI, E.; BORJESSON, D.L. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. **Stem Cells Dev.** v.21, p. 273-283, 2012.

VIEIRA, D.P. **Avaliação dos efeitos da inibição de cadeias inflamatórias e da suplementação exógena de CXCL 12 na hematopoiese de modelos experimentais expostos a doses letais ou subletais de radiação gama (Tese)**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

VOSS, C. Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. **Biotechnol. Annu. Rev.** v.13, p. 201-222, 2007.

WANG, J.; LIAO, L.; TAN, J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. **Expert Opin. Biol. Ther.** v.11, p.893-909, 2011.

WILLING, M. C., DESCHENES, S.P.; SCOTT, D.A.; BYERS, P.H.; SLAYTON, R.L.; PITTS, S.H.; ARIKAT, H.; ROBERTS, E.J. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. **Am. J. Hum. Genet.** v.55, p. 638-647, 1994.

WILLING, M. C., DESCHENES, S.P.; SLAYTON, R.L.; ROBERTS, E.J. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null allele in osteogenesis imperfecta type I cell strains. **Am. J. Hum. Genet.** v.59, p. 799-809, 1996.

YE, X.; ZHANG, P.; XUE, S.; XU, Y.; TAN, J.; LIU, G. Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model. **Cytotherapy** v.16, p. 1643-1655, 2014.

ZACARIAS, E. A. **Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região downstream, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica (Dissertação)**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 2810-5553
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.