

Avaliação da melhora do fenótipo da osteogênese imperfeita tipo I em modelo murino utilizando a administração do gene do hormônio de crescimento de camundongo

Alissandra de Moura Gomes e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

A osteogênese imperfeita (OI) é uma doença hereditária do tecido conjuntivo, caracterizada pela fragilidade, deformidade e baixa densidade óssea, além de outras manifestações clínicas. É causada por mutações nos genes COL1A1 e COL1A2 do colágeno tipo I, que resultam na síntese reduzida da quantidade de colágeno normal ou na síntese de uma molécula estruturalmente anormal. A OI do tipo I é a forma mais branda da doença, caracterizada por fragilidade, baixa densidade óssea e reduzido tamanho corporal. É causada por uma mutação *nonsense* do gene COL1A1, resultando na produção de cerca de 50% de colágeno normal [1].

O modelo animal deste tipo de OI, conhecido como camundongo *oim*, apresenta, ao contrário da doença em humanos, uma mutação de deleção no gene COL1A2 do colágeno tipo I, que altera cerca de 50 aminoácidos da proteína, gerando um fenótipo muito similar à OI tipo I humana. Portanto, esses animais são amplamente utilizados em estudos visando o desenvolvimento de tratamentos para esta doença [2].

Um dos tratamentos utilizados para a OI é a administração de hormônio de crescimento humano recombinante, com o objetivo de promover aumento da densidade mineral óssea e do tamanho corporal, porém esta abordagem ainda apresenta alguns inconvenientes como os dispendiosos processos de purificação e de controle de qualidade da proteína, além da

necessidade de repetidas injeções que causam desconforto ao paciente [1].

Desta forma, neste projeto, buscamos pela utilização da terapia gênica, avaliar os efeitos da expressão do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) e do seu principal efector, o fator semelhante à insulina I murina (mIGF-I). Esta abordagem utilizará a técnica de injeção direta e subsequente eletroporação de DNA plasmidial com o gene do mGH em camundongos *oim*, baseando-se na experiência do nosso grupo de pesquisa [3].

OBJETIVO

O principal objetivo é avaliar a melhora do fenótipo da osteogênese imperfeita (OI) do tipo I em modelo murino (camundongos *oim*), após administração do gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) por eletrotransferência muscular.

METODOLOGIA

Camundongos *oim* heterozigotos (*oim/wt*), mantidos no Biotério do IPEN, foram separados em dois grupos e anestesiados com uma mistura de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. O primeiro grupo (n=4) recebeu uma aplicação em cada músculo tibial anterior da enzima hialuronidase (20 U/20 µl), e após 30 minutos, duas aplicações de 50 µg/20 µl do DNA plasmidial pUC-UBI-mGH em cada músculo. O segundo grupo (n=4) recebeu duas aplicações de 20 µl de solução salina em cada músculo tibial anterior. Logo após a aplicação, o músculo injetado foi submetido à aplicação de três pulsos de 375 V/cm de 25 ms. Três dias após a

aplicação, o sangue dos animais foi coletado para dosagem de mIGF-I e de mGH, por ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Foram utilizados camundongos *wildtype* como controle (n=3). Além disso, foram realizadas padronizações nos testes de flexão de três pontos e de densitometria óssea, utilizando animais normais, heterozigotos e homozigotos para Ol. O teste de densitometria óssea foi realizado utilizando o aparelho *In vivo Imaging System FX PRO*, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas IV.

As imagens radiográficas dos fêmures direitos foram geradas com um filtro a fim de oferecer maior precisão para medir a densidade dos raios X. O teste de flexão de três pontos ou biomecânico foi realizado na UNIFESP, utilizando um equipamento universal (modelo 3342, Instron) nos fêmures direitos dos mesmos animais utilizados no teste de densitometria. O aparelho foi configurado utilizando velocidades de descida de 1 mm/min e 3 mm/min; força aplicada em regiões distintas do osso (parte proximal, distal ou central da diáfise) e direção da aplicação da força (antero-posterior ou postero-anterior). Além disso, foram testados apoios de 0,6; 0,8 e 1 cm.

RESULTADOS

Os níveis de mGH do grupo que recebeu o plasmídeo foram de $23,0 \pm 6,6$ ng/ml, bem maiores do que o grupo que recebeu solução salina ($3,23 \pm 2,2$ ng/ml), e do grupo de camundongos normais ($2,24 \pm 1,29$ ng/ml). Os níveis de mIGF-I foram bem similares entre os grupos: o que recebeu o plasmídeo apresentou uma concentração de $726,9 \pm 169,5$ ng/ml, o grupo que recebeu solução salina apresentou $730,8 \pm 62,7$ ng/ml, e o grupo normal $727,0 \pm 318,6$ ng/ml. Esses resultados foram similares a experimentos anteriores realizados pelo grupo [3].

Quanto à densitometria óssea, o grupo homozigoto apresentou uma média de $0,994 \pm 0,133$ g/cm³, o grupo heterozigoto apresentou uma média de $1,202 \pm 0,176$ g/cm³, e o grupo normal apresentou uma média de $1,250 \pm 0,07$ g/cm³. Com esses parâmetros poderemos avaliar, após tratamento com o gene do mGH, a melhora do conteúdo mineral ósseo dos camundongos heterozigotos.

Os resultados do primeiro teste biomecânico mostraram que os parâmetros para melhor avaliação da fragilidade óssea são o apoio de 0,8 cm, velocidade de 3 mm/min e aplicação da força antero-posterior na parte central da diáfise dos fêmures.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, acreditamos que a injeção de DNA plasmidial contendo o gene mGH trará resultados significativos para a melhora do fenótipo da doença em camundongos oim, em ensaios subsequentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis Imperfecta. *The Lancet*, v. 387, p. 1657-1671, 2016.
- [2] KING, D.; JARJOURA, D.; MCEWEN, H. A.; ASKEW, M. J. Growth hormone injections improve bone quality in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *J. Bon. Min. Res.* v. 20, p. 987-993, 2005.
- [3] 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.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq e FAPESP