

Determinação da densidade e fragilidade óssea de camundongos com osteogênese imperfeita visando o tratamento com o gene do hormônio de crescimento murino

Vanessa de Luna Yosidaki e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A osteogênese imperfeita (OI), popularmente conhecida como doença dos ossos frágeis ou quebradiços, é um distúrbio hereditário do tecido conjuntivo e se manifesta, principalmente, no tecido ósseo. É caracterizada pela fragilidade e baixa densidade óssea, deformidades no esqueleto e deficiência de crescimento, além de outras manifestações sistêmicas muito variadas. Estas anormalidades são causadas, em geral, por mutações nos genes COL1A1 no cromossomo 17 e COL1A2 no cromossomo 7, os quais codificam, respectivamente, as cadeias $\alpha 1$ (I) e $\alpha 2$ (I) do colágeno tipo I. Essas alterações 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 e é causada por uma mutação *nonsense* do gene COL1A1, produzindo cerca de 50% de colágeno normal [1].

O modelo animal murino para este tipo de OI, conhecido como camundongo *oim*, apresenta uma deleção no gene COL1A2 do colágeno tipo I, que altera cerca de 50 aminoácidos da proteína, gerando um fenótipo similar ao da OI tipo I humana. Em vista disso, esses animais estão sendo amplamente utilizados em estudos visando o desenvolvimento de tratamentos para esta doença [2].

Um dos tratamentos utilizados para a OI é a administração do hormônio de crescimento humano (hGH) recombinante, com o objetivo de promover o aumento da densidade mineral óssea e do tamanho corporal, porém trata-se de um tratamento dispendioso, e que requer aplicações diárias no

paciente. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens, como por exemplo, a técnica de injeção direta e subsequente eletroporação de DNA plasmidial com o gene do mGH, baseando-se na experiência do nosso grupo de pesquisa, na área de terapia gênica [3].

Portanto, para viabilizar esse tratamento é necessário realizar uma determinação prévia, da densidade e fragilidade óssea em camundongos *oim* heterozigotos e camundongos selvagens.

OBJETIVO

Determinar a densidade e fragilidade óssea de camundongos *oim* e normais e estabelecer os parâmetros de avaliação da terapia proposta. Para, a partir destas avaliações, realizar um bioensaio de longa duração.

METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos *oim* heterozigotos (*oim/wt*) machos (n=6) e fêmeas (n=6), e um grupo controle selvagem (*wt/wt*), com camundongos machos (n=6) e fêmeas (n=6), de aproximadamente 40 dias, os quais foram mantidos no Biotério do IPEN. Para o teste de densitometria óssea do fêmur foi utilizado o equipamento *In vivo Imaging System FXPRO*, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP. Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina e quetamina, via intraperitoneal, e mantidos sob anestesia durante toda a aquisição da imagem. As imagens radiográficas dos fêmures direitos e esquerdos foram geradas e analisadas utilizando o *software Molecular Imaging Software*, integrado ao equipamento. O teste biomecânico foi realizado na

UNIFESP, na unidade Baixada Santista, utilizando uma máquina de teste universal (modelo 3342, Instron) nos fêmures direitos e esquerdos. Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 500 N e pré-carga de 5 N em apoio de 0,80 cm. A força de flexão foi aplicada na direção antero-posterior na parte central da diáfise dos fêmures com uma tensão constante de 3 mm/minuto até a ocorrência da fratura. Os parâmetros analisados foram resistência à fratura (N) e o tempo de quebra (s) os quais, juntos refletem as propriedades do tecido ósseo.

RESULTADOS

De acordo com os dados obtidos após o teste de densitometria óssea, conforme a Tabela 1, a significância entre fêmeas e machos *oim* em relação aos camundongos normais foi de $p < 0,05$.

Tabela 1. Determinação da densitometria óssea.

Grupo	n	Densidade óssea (g/cm ³)
Machos (<i>oim/wt</i>)	6	0,82 ± 0,06
Fêmeas (<i>oim/wt</i>)	6	0,69 ± 0,03
Machos (<i>wt/wt</i>)	6	0,69 ± 0,04
Fêmeas (<i>wt/wt</i>)	6	0,63 ± 0,03

Os resultados do teste biomecânico estão apresentados na Tabela 2. Houve apenas significância entre machos *oim/wt* e *wt/wt* de $p < 0,05$, em que os camundongos *oim* apresentaram carga máxima maior que os *wild-type*.

Quanto ao tempo de quebra, podemos observar que este, foi maior nas fêmeas e nos machos *wt/wt* quando comparadas com fêmeas e machos *oim/wt*.

Tabela 2. Resultados do teste biomecânico

Grupo	n	Carga máxima (N)	Tempo de quebra (s)
<i>oim/wt</i>			
Machos-D	3	8,55 ± 2,03	6,52
Machos-E	5	6,62 ± 2,40	
Fêmeas-D	5	3,80 ± 0,83	13,24
Fêmeas-E	3	3,84 ± 1,03	
<i>wt/wt</i>			
Machos-D	4	4,58 ± 1,57	45,72
Machos-E	6	5,15 ± 2,15	
Fêmeas-D	4	3,26 ± 1,32	37,43
Fêmeas-E	4	3,72 ± 0,98	

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesta fase do projeto, concluímos que, para os próximos bioensaios, os animais utilizados deverão ser todos do mesmo sexo, e o tempo de tratamento deverá ser prolongado, para melhor avaliar os efeitos da abordagem proposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis Imperfecta. *The Lancet*, v.387, p. 1657-1671, 2016.
- [2] CARRIERO, A.; ZIMMERMANN, E. A.; PALUSZNY, A.; et. al. How tough is brittle bone? Investigating osteogenesis imperfecta in mouse bone. *J. Bone Miner. Res.*, v.26, p. 1392-1401, 2014.
- [3] 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.

APOIO FINANCEIRO

CNPq /PIBIC