



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MAIRA TRANCOZO

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DA
OSTEOGÊNESES IMPERFEITA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES RESVERATROL, ÁCIDO ASCÓRBICO
E CURCUMINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

VITÓRIA, ES

2022

MAIRA TRANCOZO

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DA
OSTEOGÊNESES IMPERFEITA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES RESVERATROL, ÁCIDO ASCÓRBICO
E CURCUMINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

T772c Trancozo, Maira, 1987-
CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DA OSTEOGÊNESES IMPERFEITA E AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS DE ANTIOXIDANTES RESVERATROL, ÁCIDO ASCÓRBICO E CURCUMINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS / Maira Trancozo. - 2022.
78 f. : il.

Orientadora: Flavia de Paula.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Osteogenesis Imperfecta. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. COL1A1, COL1A2, P3H1, FKBP10, IFITM5. 4. Resveratrol. 5. Ácido ascórbico. 6. Curcumina. I. de Paula, Flavia. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

MAIRA TRANCOZO

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE MUTAÇÕES DA
OSTEOGÊNESES IMPERFEITA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES RESVERATROL, ÁCIDO ASCÓRBICO
E CURCUMINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Apresentada no dia 03 de fevereiro de 2022

Prof^a. Dr^a. FLAVIA DE PAULA

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Prof^a. Dr^a. MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro Interno

Prof^a. Dr^a. DÉBORA DUMMER MEIRA

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro Interno

Prof. Dr. CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA

Universidade Federal de Juiz de Fora

Membro Externo que participou da qualificação

Prof^a. Dr^a. AGNES LUMI NISHIMURA

Queen Mary University of London

Membro Externo

VITÓRIA, ES

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me sustentado e me mantido até aqui, se não fosse sua direção eu jamais teria iniciado esse doutorado.

Agradeço aos meus pais por sempre me incentivarem a prosseguir em meus estudos e por me darem condições de chegar até aqui. Sem eles tudo seria muito mais difícil.

Agradeço aos meus amigos e colegas que me socorrem em todos os momentos em que precisei dele.

Agradeço a todos que oraram por mim e pela conclusão dessa fase de minha vida. Em especial a Pastora Marta e a Débora. Obrigada por não se esquecerem de mim em suas orações e pelo apoio que me derem sempre que precisei.

Obrigada Suany e Iasmini, nesses últimos meses vocês me ajudaram muito.

Agradeço aos meus alunos de iniciação científica por estarem ao meu lado e por me ajudar sempre que precisei. Saibam que vocês contribuíram para a profissional que sou hoje.

Agradeço a equipe de profissionais do Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES, sem vocês esta pesquisa não seria viável. Obrigada por terem me ajudado. Em especial gostaria de agradecer a duas pessoas, ao Roger por fazer o possível e às vezes o impossível para me ajudar, sempre que eu perdia tudo você estava lá para me ajudar a recomeçar. Obrigada por sempre se lembrar de mim, principalmente nesses últimos meses do doutorado, obrigada pela sua amizade e dedicação. E a Rosimere por me ajudar no contato com as famílias dos pacientes, obrigada por sua boa vontade e disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço ao Professor Carlos por ter cedido seu tempo e seu laboratório para que eu pudesse receber o devido treinamento em cultura de células. Obrigada por contribuir para minha formação.

Agradeço a Professora Maria do Carmo e Sílvia por cederem o espaço e reagentes para que esta pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Agradeço a Flavia minha orientadora desde a graduação. Com você aprendi muito e continuo aprendendo não só na minha vida acadêmica, mas também na vida como um todo. Obrigada por ser a excelente pessoa que você é sempre disposta a ajudar e me acalmar nos meus momentos de aflição e por acreditar em mim a todo o momento.

Agradeço a equipe do NGHМ pelo apoio e a à UFES, à CAPES, FAPES-PPSUS e a FAPES pelo apoio acadêmico e financeiro.

EPÍGRAFE

“Então Samuel tomou uma pedra e a pôs entre Mispá e Sem, e lhe chamou Ebenézer; e disse: até aqui nos ajudou o Senhor”. (1 Samuel 7:12)

RESUMO

TRANCOZO, M. Caracterização do padrão de mutações da Osteogênese Imperfeita e avaliação *in vitro* dos efeitos de antioxidantes resveratrol, ácido ascórbico e curcumina em células-tronco mesenquimais. 2022. 78f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A Osteogenesis Imperfecta (OI) é uma doença hereditária dos tecidos conjuntivos que contém colágeno em sua formação. Já foram relatados mais de 20 genes relacionados a OI nos últimos anos. A maioria dos casos ocorrem devido a mutações herdadas com padrão autossômico dominante nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* que codificam as fibras da proteína de colágeno tipo I. Mutações em outros genes herdadas com padrão recessivo também já foram descritos. A OI não tem cura, porém existem tratamentos que podem promover uma significativa melhora na qualidade de vida nos indivíduos afetados. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar o padrão de mutações em genes relacionados com a OI em pacientes do estado do Espírito Santo e avaliar os efeitos *in vitro* de antioxidantes em células-tronco mesenquimais de pacientes. Para a análise molecular das mutações foram utilizadas as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), sequenciamento de Sanger e/ou Triagem de mutações por polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). A avaliação do efeito de antioxidantes foi realizada em células-tronco mesenquimais por meio do tratamento das culturas com resveratrol, ácido ascórbico e curcumina e avaliação da viabilidade celular. As amostras desta pesquisa foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória/ES. Para análise da caracterização de mutações foram estudados os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* e *IFITM5* em 29 pacientes. Como esperado, a maioria dos indivíduos (23/29) apresentou mutações em *COL1A1* ou *COL1A2*. Aproximadamente 10% dos pacientes (3/29) eram portadores de mutações no gene *FKBP10*. Foi identificado um paciente portador de uma mutação no gene *IFITM5* e outro paciente portador de mutações no gene *P3H1*. Os resultados sugerem que o estudo destes cinco genes é capaz de identificar 95% das mutações em pacientes brasileiros com OI. Os resultados de avaliação da proliferação celular nas culturas de células-tronco mesenquimais sugerem que a exposição a curcumina provoca comprometimento da viabilidade celular em quase 80%, o que indica que este composto provoca morte celular em cultura. Por outro lado, foi observado aumento da proliferação celular em células tratadas com resveratrol e ao ácido ascórbico. Este resultado sugere que os compostos Resveratrol, Ácido ascórbico são potenciais alvos no tratamento de doenças e poderiam ser investigados quanto a sua potencialidade na melhora da mineralização ossea. Os resultados desta pesquisa podem ajudar no planejamento de estratégias mais eficientes de diagnóstico molecular, bem como, na identificação de novos compostos em potencial para o tratamento da OI, contribuindo, no futuro, com o aconselhamento genético e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: *IFITM5*, *FKBP10*, *P3H1*, NGS, viabilidade celular, cultura celular

ABSTRACT

TRANCOZO M. Characterization of the Osteogenesis Imperfecta mutation pattern and *in vitro* evaluation of the effects of resveratrol, ascorbic acid and curcumin antioxidants on mesenchymal stem cells. 2022. 78p. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Osteogenesis Imperfecta (OI) is an inherited disorder of connective tissues that contain collagen in their formation. More than 20 OI-related genes have been reported in the last years. Most cases happen due mutations inherited with autosomic dominant inheritance in the *COL1A1* or *COL1A2* genes that codifying the collagen fibers type I proteins. Mutations with recessive inheritance were also related to the disease. There is no cure for OI, but some treatments can significantly improve the quality of life of affected individuals. Therefore, this work aimed to characterize the pattern of mutations in OI-related genes in patients from Espírito Santo state/Brazil as well as search for new OI treatments. The techniques of next generation sequencing (NGS), Sanger sequencing and/or Screening of mutations by single-stranded conformational polymorphism (SSCP) were used for the molecular analysis of the mutations. We focused on evaluating whether antioxidants are able to improve the cellular proliferation *in vitro* experiments in the search for new OI treatments. The samples of this research were obtained from patients treated at the Nossa Senhora da Glória Children's Hospital in Vitória/ES, Brazil and at the Dório Silva Hospital/ES, Brazil. The *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes were studied in 29 patients for the analyze the mutations. As expected, most individuals (23/29) carried mutations in *COL1A1* or *COL1A2* genes. Approximately 10% of the patients (3/29) had mutations in the *FKBP10* gene. We found one mutation in the *IFITM5* gene in one patient and another change in the *P3H1* gene in other patient. The results suggest that the study of these five genes is able to identify 95% of OI mutations in Brazilian patients. Stem cell cultures were exposed to the antioxidants Resveratrol, Ascorbic Acid and Curcumin to search for compounds that improve cellular proliferation. Samples treated with Curcumin had their cell viability compromised by almost 80. This result suggests that Curcumin causes cell death in culture. By the other hand, increased cell proliferation was observed in cells treated with resveratrol and ascorbic acid. This result suggests that the compounds Resveratrol, Ascorbic acid are potential targets in the treatment of diseases and could be analyzed how much they can improve the bone mineralization. The results of this research can help in the planning of more efficient molecular diagnostic strategies, as well as in the identification of new compounds for the treatment of OI, contributing, in the future, for genetic counseling and improving the life quality of patients.

Key words: *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *FKBP10*, *P3H1* and *Resveratrol and Ascorbic Acid*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa do exemplar dissecado por Willem Vrolik (BALJET et al., 2002).....	14
Figura 2: Radiografia do exemplar encontrado pelo professor John Garstang (GRAY, 1969)	15
Figura 3: Formação do colágeno tipo 1 e os genes envolvidos no processo (TOURNIS, 2018).....	16
Figura 4: estrutura do Resveratrol (a) conformação trans-, (b) conformação cis-	25
Figura 5: Fases da remodelação óssea e seus componentes (FENG e MCDONALD, 2011).	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de Sillence e colaboradores (1979)	16
Quadro 2: nova classificação da OI (modificado de CHETTY et. al. 2020; EL-GAZZAR e HÖGLER et. al. 2021).....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius

µL – microlitro

AA – Ácido Ascórbico

ALP – fosfatase alcalina

ALP – gene que codifica a proteína ALPL *Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme*

BMP1 – gene da BMP1 Bone Morphogenetic Protein 1

cDNA – DNA complementar

COL1A1 – gene do colágeno tipo I, alfa I

COL1A2 – gene do colágeno tipo I, alfa II

CREB3L1 – gene da OASIS *old astrocyte specifically induced substance*

CRTAP – gene da *Cartilage-Associated Protein*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERN – espécies reativas de Nitrogênio

ERRO – Espécies reativas de Oxigênio

ES – Espírito Santo

FKBP10 – gene da *FK506-Binding Protein 10*

Gly - Glicina

GTP – guanosina trifosfato

GULO – L-gulonolactona oxidase ()

HCL – cloreto de hidrogênio

HINSG – Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

Hsp47 – *Heat-Shock Protein 47*

IFITM5 – gene da BRIL *Bone-restricted ifitm-like protein*

LEPRE1- gene da prolil-3 hidroxilase

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ng – nanogramas

ng/uL – nanograma por microlitro

OCN – osteocalcina

OI - Osteogênese Imperfeita

P3H1 – prolil-3 hidroxilase

PBS – *phosphate-buffered saline*.

PCR – *polymerase chain reaction* ou reação em Cadeia da Polimerase

PHD – proli hidroxilase

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

PLS3 – gene da *Actin-binding protein plastin 3*

PPIase – *peptidil-prolil isomerases cis-trans*

PPIB – gene da ciclofilina B

Q-PCR – *quantitative PCR* ou PCR quantitativo

RE – retículo endoplasmático

RES – Resveratrol

RNA – Ácido ribonucleico

Runx2 – gene da proteína Runx2

Sec24D – gene da Sec24D

SERPINF1 – gene da *Pigment epithelium derived factor*

SERPINH1 – gene da *serpin peptidase inhibitor*

SFB – Soro fetal Bovino (),

SIRT1 – Sirtuina 1

SP7/Osterix – *Transcription Factor Sp7*

SPARC – gene da SPARC

TGF- β – fator de crescimento transformante ()

TMEM38B – *Transmembrane Protein 38B*

TRIC-B – *Trimeric Intracellular Cation Channel Type B*

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

WNT1 – *wingless-type MMTV integration site family, member 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA.....	16
2.2 <i>OSTEOGENESIS IMPERFECTA</i>	17
2.3 CLASSIFICAÇÃO.....	18
2.4 COLAGENO TIPO 1 E OS ASPECTOS MOLECULARES DA OI	19
2.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	22
2.6 ANTIOXIDANTES.....	23
2.6.1 Classificação dos antioxidantes.....	24
2.6.1.1 Resveratrol.....	25
2.6.1.2 Ácido ascórbico.....	27
2.6.1.3 Curcumina.....	29
2.7 DESENVOLVIMENTO ÓSSEO.....	30
2.7.1 Início do desenvolvimento esquelético.....	31
2.7.2 Os três principais tipos celulares.....	32
2.7.3 A composição histológica.....	33
2.7.4 A remodelação óssea.....	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 AMOSTRAS.....	37
4.2 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA DO SANGUE PERIFÉRICO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES EM OI.....	37
4.2.1 Extração de DNA.....	37
4.2.2 Amplificação do DNA.....	37
4.2.3 Purificação, sequenciamento e análise dos resultados.....	38
4.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA DE TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE CELULAR.....	38
4.3.1 Processamento do tecido adiposo.....	38
4.3.2 Diferenciação osteogênica.....	39
4.3.3 Diferenciação adipogênica.....	39

4.3.4 Diferenciação condrogênica.....	39
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO CELULAR POR MEIO DE ANTIOXIDANTES....	40
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico por MTT.....	40
4.4.2 Avaliação da diferenciação e mineralização celular mediante exposição celular por antioxidantes.....	41
4.4.3 Avaliação do grau de mineralização.....	41
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES RELACIONADOS A REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	41
4.5.1 Extração de RNA.....	42
4.5.2 Avaliação dos transcritos.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 ARTIGO 1 PUBLICADO.....	43
5.2 ARTIGO 2 EM ANDAMENTO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	52
7 PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A *Osteogenesis Imperfecta* (OI) é uma doença mendeliana que possui ampla heterogeneidade clínica e genética. Aproximadamente 75% dos pacientes são portadores de mutações em genes que codificam a proteína de colágeno tipo I, contudo, já foram identificados 20 genes distintos que podem causar OI quando mutados. A caracterização do padrão de mutações dos genes preferencialmente mutados em diferentes populações pode ajudar no planejamento de estratégias mais eficientes de diagnóstico molecular. Os sintomas de maior relevância da OI são fraturas recorrentes e deformidades ósseas que ocorrem, na maioria dos casos, devido ao comprometimento da proteína de colágeno tipo I presente nos ossos. O tecido ósseo, uma das estruturas mais importantes do corpo humano, apresenta não só função de sustentação e proteção de órgãos moles, como também de produção de células sanguíneas, regulação de hormônios e armazenamento de íons. Alterações deste tecido, como ocorre na *Osteogenesis Imperfecta*, podem causar graves problemas de saúde. A busca por compostos que possam ser utilizados como potenciais estratégias de tratamento pode trazer impacto relevante na qualidade de vidas dos pacientes portadores desta enfermidade. Neste contexto destacam-se os antioxidantes, moléculas produzidas pelo organismo ou obtidas por meio da alimentação, que atuam impedindo a oxidação de outras moléculas ao combater radicais livres/espécies reativas gerados pelo metabolismo do corpo. Os antioxidantes desempenham importante papel no sequestro de espécies reativas, com consequente manutenção do equilíbrio nos processos de reabsorção óssea. Além disto, eles são compostos de fácil obtenção e que podem ser isolados de fontes naturais. Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar o padrão de mutações em pacientes com *Osteogenesis Imperfecta* do estado do Espírito Santo e buscar compostos antioxidantes que sejam promissores no desenvolvimento de novas terapias para tratamento da *Osteogenese Imperfeita*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HISTÓRICO DA DOENÇA

Em 1849 o professor de anatomia Willem Vrolik, ao investigar as ocorrências de displasias ósseas notou que em sua grande maioria acompanhavam os indivíduos desde sua formação uterina. Essa condição, segundo ele, poderia ser pela insuficiência de uma “energia generativa” durante a formação do feto. Ele corroborou sua hipótese quando estudou peças anatômicas onde observou o comprometimento na ossificação primária ao invés de uma degeneração secundária. Por meio de um exemplar doado por seu pai, o também anatomista Gerard Vrolik, ele faz uma descrição de um recém nascido, morto aos três dias de vida, que apresentava numerosas fraturas no crânio, assim como os demais ossos, problemas no desenvolvimento esquelético, rosto curto e estreito e a presença de calos ósseos (Figura 1), publicado esse achado em seu livro *Patologias Anatômicas*, sendo ele o primeiro a utilizar o termo *Osteogenesis Imperfecta* para nomear a condição descrita (BALJET et al., 1984 e 2002).

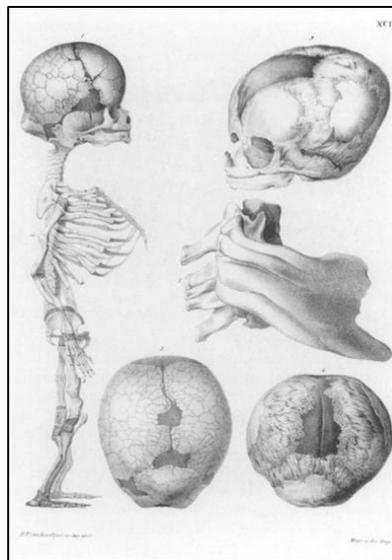


Figura 1: Figura representativa do exemplar dissecado por Willem Vrolik (BALJET et al., 2002)

Vrolik também pôde observar que a mesma família da criança já citada teve outro filho em que o mesmo apresentava as mesmas características do primeiro filho. Estes dois casos foram posteriormente classificados com OI tipo II em 1998 (OOSTRA et al., 1998b).

Enquanto Vrolik descrevia o primeiro caso de OI infantil, Jean Frederick Lobstein documentava o primeiro caso de OI adulta. Em meados do século 20 Looser of Heidelberg, utilizou pela primeira vez os termos OI tardia e OI congênita, os quais são utilizados até hoje na prática clínica (Chetty, 2020)

Em 1907 o professor John Garstang encontrou uma múmia egípcia de cerca de 1.000 anos a.C, sendo que a mesma apresentava características comuns ao quadro de OI (FIGURA 2), porém, somente em 1969 Gray descreveu e classificou o que então seria o primeiro caso de OI, descrito por meio de observações e exames radiológicos (GRAY et al., 1969; LOWENSTEIN et al., 2009).



Figura 2: Radiografia do exemplar encontrado pelo professor John Garstang (GRAY, 1969)

1.2 OSTEOPENIA IMPERFECTA

Osteogenesis Imperfecta (OI) é uma doença genética que acomete em torno de 1:10.000 a 1:20.000 nascidos. Ela é uma enfermidade que acomete o tecido conjuntivo, onde há predominância de colágeno tipo I, a principal proteína constituinte do tecido conjuntivo ósseo. As alterações genéticas que acometem os pacientes estão predominantemente nos genes (*COL1A1* e *COL1A2*) que codificam a proteína em questão (TOURNIS and DEDE, 2017; ROSSI, 2019).

Dependendo da severidade do quadro do paciente pode-se observar características típicas da OI tais como, esclera azulada, ossos quebradiços e com deformações, audição comprometida, dentinogênese imperfeita e problemas cardíacos.

Como esta condição provoca inúmeras características, sendo que as mesmas podem apresentar diferentes graus de severidade, tornou-se necessário fazer uma classificação da doença para o melhor diagnóstico dos pacientes (ROSSI, 2019).

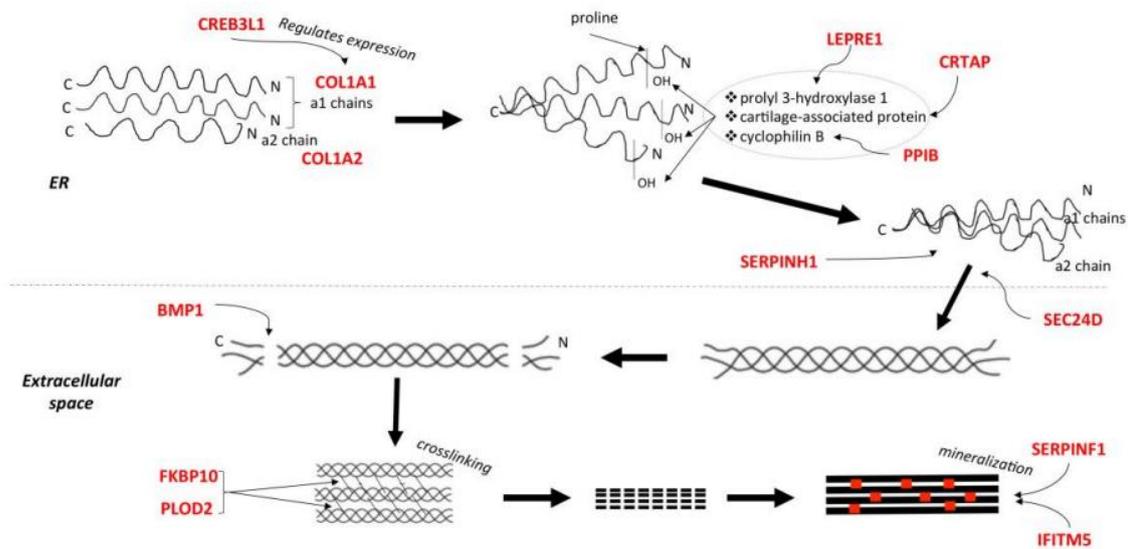


Figura 3: Formação do colágeno tipo 1 e os genes envolvidos no processo (TOURNIS, 2018)

1.3 CLASSIFICAÇÃO

Em 1989, Sillence e col. realizaram uma classificação clínica da OI. Esta classificação faz uma divisão em quatro tipos principais da *Osteogenesis Imperfecta* que vão do quadro mais leve até o letal da doença (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação de Sillence e colaboradores (1979)

Tipo de OI	Classificação clínica
I	Esclera azulada, fragilidade óssea moderada
II	Letal no período perinatal
III	Esclera branca, com deformidade progressiva grave
IV	Esclera branca com fragilidade óssea variável

Porém, com o passar dos anos e com o advento de novas pesquisas relacionadas as bases genéticas da OI, formularam-se novas classificações em que levaram em consideração os genes envolvidos. A mais recente delas é de Chetty e colaboradores de 2020 (Quadro2) onde pode-se ver o tipo atual de OI, o tipo de herança, o gene e a proteína envolvidos e em que etapa da formação óssea estão envolvidos.

Nos casos em que não se tem acesso ao resultado genético dos pacientes o diagnóstico clínico é realizado com base na classificação de Sillence e col. (1979).

1.4 COLAGENO TIPO 1 E OS ASPECTOS MOLECULARES DA OI

Como mencionado anteriormente os genes mais afetados, no que diz respeito às mutações que levam OI, são os genes que codificam o colágeno tipo 1. Este tipo de colágeno é o mais abundante constituinte da matriz óssea, sendo composto por duas cadeias alfa-1 (gene COL1A1) e uma cadeia alfa-2 (gene COL1A2) de pró-colágeno, constituindo então uma fibrila em tripla hélice. Cada cadeia alfa contém um padrão triplo de aminoácido (Gly -X-Y) que ocorrem com frequência ao longo de sua estrutura, Gly (gliciana) –X (normalmente prolina) -Y (geralmente hidroxiprolina).

Inicialmente a formação do pró-colágeno tipo 1 é iniciada no retículo endoplasmático a partir da extremidade amino a carboxi-terminal. Principalmente durante a tradução ela sofre modificações que promovem sua melhor conformação de maneira mais efetiva e rápida, evitando assim alterações indesejadas em sua estrutura. Durante todo esse processo várias proteínas e genes diferentes trabalham de maneira

coordenada para que o resultado final seja o adequado (Figura 3). Tais genes codificam proteínas que se alterados promovem defeitos de síntese, estrutura ou processamento do *COL1A1* e *COL1A2*, incluindo a clivagem de uma da extremidade carboxi termina por BMP1. Além disso genes como o *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB* e *TMEM38B* são responsáveis por modificações pós-traducionais do colágeno tipo 1 por promoverem o dobramento ideal do mesmo. Já os genes *SERPINH1*, *FKBP10*, *PLOD2* e *P4HB* são responsáveis por sua reticulação. Sobre tudo ainda existem genes que promovem modificações na mineralização (*IFITM5* e *SERPINF1*) e outros que podem causar defeitos na diferenciação dos osteoblastos (*SP7*, *WNT1* e *CREB3L1*) (EL-GAZZAR e HÖGLER, 2021).

Por tudo o que foi exposto acima vê-se que defeitos genéticos nesses genes mostraram ser relevantes na causa da OI por participarem ativamente na formação da matriz óssea (TOURNIS, 2018). Os genes, suas respectivas proteínas e funções celulares estão listados no quadro 2.

Quadro 2: Nova classificação da OI (modificado de CHETTY et. al. 2020; EL-GAZZAR e HÖGLER et. al. 2021)

Diagnóstico Molecular OMIM	Herança	Gene	Proteína	Mecanismo da doença	Fenótipo
OI tipo I	AD	<i>COL1A2</i>	Collagen type 1, $\alpha 1/2$	Processamento/síntese do colágeno	Leve a moderada
OI tipo II	AD	<i>COL1A2</i>	Collagen type 1, $\alpha 1/2$	Processamento/síntese do colágeno	Letal
OI tipo III	AD	<i>COL1A2</i>	Collagen type 1, $\alpha 1/2$	Processamento/síntese do colágeno	Grave
OI tipo IV	AD	<i>COL1A2</i>	Collagen type 1, $\alpha 1/2$	Processamento/síntese do colágeno	Moderada
OI tipo V	AD	<i>IFITM5</i>	Interferon-induced transmembrane protein 5	Defeito na mineralização	Moderada
OI tipo VI	AR	<i>SEPINF1</i>	Pigment epithelium-derived fator	Defeito na mineralização	Moderada a grave
OI tipo VII	AR	<i>CRTAP</i>	Cartilageassociated protein	Modificações no colágeno	Grave a letal
OI tipo VIII	AR	<i>LEPRE1</i>	Leucine prolineenriched proteoglycan 1/prolyl 3-hydroxylase 1	Modificações no colágeno	Grave a letal
OI tipo XI	AR	<i>PPIB</i>	Peptidylprolyl isomerase B/cyclophilin B	Modificações no colágeno	Grave
OI tipo X	AR	<i>SERPINH1</i>	Serpin peptidase inhibitor	Chaperona defeituosa para dobramento de colágeno	Grave
OI tipo XI	AR	<i>FKBP10</i>	FK506 binding protein 65	Chaperona defeituosa para dobramento de colágeno	Moderada a grave
OI tipo XII	AR	<i>SP7</i>	Transcription factor 7	Desenvolvimento de osteoblastos	Moderada
OI tipo XIII	AR	<i>TMEM38B</i>	Transmembrane protein 38 B	Modificações no colágeno	Grave

OI tipo XIV	AR	<i>BMP1</i>	Bone morphogenic protein 1	Síntese/processamento do colágeno	Leve a grave
OI tipo XV	AD/AR	<i>WNT1</i>	Wingless-type member 1	Desenvolvimento de osteoblastos	Moderada a grave
OI tipo XVI	AR	<i>CREB3L1</i>	CAMP responsive element binding	Desenvolvimento de osteoblastos	Grave
OI tipo XVII	AR	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (SPARC, or osteonectin)	Processamento de procolágeno e montagem extracelular	Moderada a grave
OI tipo XVIII	AR	TENT5A (FAM24A)	Terminal nucleotidyltransferase 46, Member A (FAM46A)	Sinalização BMP	Grave
OI tipo XIX	XL	MBTPS2	Site 2 protease (S2P)	Regulado por Golgi proteólise intramembranar	Moderada a grave
OI tipo XX	AR	MESD	Mesoderm development LRP chaperon	Sinalização WNT	Grave
Não informado	AR	SEC24D	SEC24D	ER COPII Transporte de procolágeno	Grave
Não informado	AR	CCDC134	Coiled-coil domain containing 134	Caminho MAPK	Grave
Não informado	AR	KDEL2	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	Regulam o tráfego de proteínas entre o aparelho de Golgi e o RE	Grave a letal

1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da OI é realizado baseado no histórico familiar do paciente e por meio de exames clínicos, radiológicos e bioquímicos, dessa forma pode-se inferir que o tipo de OI baseado na classificação de Sillence e col., 1979. O diagnóstico molecular atualmente é realizado por meio da técnica de Sequenciamento de Próxima Geração, com painéis gênicos onde traz como alvos os genes causadores de OI. Por meio dele é possível saber a causa exata da doença, revelando assim o modo de herança da doença e a identificação dos familiares afetados quando os mesmos apresentam características muito leves da doença (PALOMO, 2017). Com os resultados conclusivos de mutações é possível utilizar a classificação de OI atual de Chetty et al. (2020).

O Tratamento da *Osteogenesis Imperfecta* é determinada levando-se em consideração a gravidade, idade e estado funcional do indivíduo acometido. Pacientes com a forma leve, terapias ortopédicas são realizadas apenas com a ocorrência de fraturas. Porém em pacientes com as formas moderadas e graves, tais abordagens são ampliadas para o tratamento de deformidades graves e fraturas múltiplas. Além do tratamento das fraturas, faz-se também o uso de bisfosfonatos intravenosos, que agem sobre os osteoclastos (célula óssea responsável pela reabsorção da matriz óssea), afim de promover o aumento da densidade mineral óssea dos pacientes, acarretando assim na diminuição da fraturas dos mesmo (PALOMO, 2017; ROSSI, 2020).

Contudo, novas formas de tratamento têm sido investigadas. Uma delas é a utilização de denosumab que, assim como o bisfosfonato, é um agente anti-reabsortivo. Outra estratégia utilizada é a administração de teriparatida, composto que promove a diferenciação e atividade de osteoblastos e anticorpos inibitórios. Estes tratamentos promovem o aumento da formação óssea por meio da sinalização Wnt. Também têm sido desenvolvidos compostos que tem como alvo a inibição da sinalização TGF-beta. Esta estratégia tem como objetivo atuar prevenindo que ocorra diminuição da densidade de massa óssea, evitando fragilidade óssea (PALOMO, 2017; ROSSI, 2020).

Na busca de terapias alternativas para diversas doenças tem se observado que compostos antioxidantes contribuem de forma positiva para o tratamento. Assim, é relevante avaliar se antioxidantes poderiam ser úteis no tratamento da OI. A avaliação de novos compostos, frequentemente, passa por diversos estudos, como análises que avaliam a segurança e eficiência de uma substância por meio de experimentos *in vitro*. Assim, análises em cultura celular de substâncias antioxidantes específicas seriam úteis na busca de tratamento complementar para a OI que ajudasse a melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

1.6 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos, que podem ser produzidos por plantas e por alguns animais, capazes de eliminar espécies reativas e seus derivados. Eles podem inibir ou retardar oxidação, sendo esta uma reação química que pode gerar radicais livres, danificadores celulares que agem em cadeia (KASOTE et al. 2015; SALEHI et al., 2018; HES et al., 2019). Espécies reativas definidas como espécies químicas que apresentam um elétron desemparelhado na última camada de valência, sendo assim eles podem ser radicais livres oxigenados ou nitrogenados (PISOSCHI et al., 2016).

Espécies reativas de Oxigênio (ERO) e espécies reativas de Nitrogênio (ERN) são moléculas produzidas a partir do metabolismo de células aeróbias. Tal produção é regida por oxidases mitocondriais ou outras organelas celulares (SALEHI et al., 2018). Quando as defesas antioxidantes do organismo estão sobrecarregadas não são capazes de atuar sobre ERO e ERN, o que pode levar a danos macromoleculares provocando uma interrupção na sinalização e no controle redox, causando assim estresse oxidativo (SALEHI et al., 2018).

Espécies Reativas de Oxigênio ou Nitrogênio são espécies químicas que tem em sua composição um elétron não emparelhado na última camada de valência. ROS apresentam moléculas de Oxigênio (O) com maior reatividade química do que o Oxigênio molecular (O₂). Dentre os principais ERO, podem ser encontrados ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (HO•), sendo estes formados a partir da redução do O₂ (KONG et al., 2017). ERO são um grupo de

moléculas que apresentam diferentes reatividades químicas tais como as que incluem radicais O₂⁻, hidroxila, alcoxila e peroxila- radicais naturais, NO e dióxido de Nitrogênio e as que não apresentam radicais peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hipoclorito, peroxinitrito, Oxigênio singlete, peróxidos lipídicos e outros (SCHMIDT et al., 2015).

Os ERO estão envolvidos em processos regulatórios como a proliferação e apoptose celular e expressão gênica, demonstrando que em baixos níveis os radicais livres são benéficos ao organismo. Porém quando gerados a níveis maiores, os mesmos podem neutralizar o sistema antioxidantes levando a prejuízo na manutenção de biomoléculas essenciais da célula levando a oxidação de lípidos da membrana, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e enzimas (PISOSCHI et al., 2016; ZHOU et al. 2019).

O processo de inicialização da defesa a partir de antioxidantes ou a redução dos níveis de ERO/ERN endógenas são indicadores consistentes de estresse oxidativo. O acúmulo de ERO/ERN no organismo está associado a distúrbios patogênicos. Tal acúmulo também está associado a dados celulares que levam a funcionamento anormal da célula e até mesmo a morte da mesma (SALEHI et al., 2018).

Na década de 70 já era de conhecimento da comunidade científica que o estresse oxidativo contribui para patologias relacionados a doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e câncer. Isto se deve a alta reatividade com lipídeos, proteínas e o DNA. Neste mesmo período, estudos publicados relataram que o uso de antioxidantes mostrou ser benéfico como agentes protetores ou terapêuticos contra tais doenças, por auxiliar no equilíbrio redox (SCHMIDT et al., 2015; KONG et al., 2017).

O equilíbrio redox é fundamental para a preservação de um microambiente celular saudável. Sendo assim, um desequilíbrio no mesmo, pode ocasionar mudanças no equilíbrio entre ERO e um sistema de defesa celular por antioxidantes eficientes, tal desequilíbrio ocorre quando a produção das espécies reativas supera a eliminação das mesmas pelo corpo (SALEHI et al., 2018).

Apesar de altos níveis de desequilíbrio redox serem prejudiciais a manutenção das células aeróbias levando a danos oxidativos e nitrosativos e morte celular, estudos recentes constataram que níveis basais de espécies reativas são importantes para a

sobrevivência celular, visto que aumentam os níveis de defesa antioxidantes da célula mediante o processo de sinalização celular, diferenciação, proliferação, envelhecimento, reparo e morte celular (SCHMIDT et al., 2015; SALEHI et al., 2018). Tal relação é descrita como uma hormose, onde as concentrações baixas do composto demonstram ter efeitos benéficos e altas doses podem exercer efeitos nocivos à célula (SCHMIDT et al., 2015; SALEHI et al., 2018).

As espécies reativas de Oxigênio e de Nitrogênio podem causar danos às células por meio de ligações covalentes a outras moléculas, fazendo com que haja um crescimento celular anormal ou até mesmo provocando a indução de senescência celular, acarretando na produção de células produtoras de citocinas em grande quantidade, que pode levar a uma reação inflamatória. Acredita-se que as substâncias antioxidantes podem bloquear os efeitos prejudiciais das espécies reativas, bloqueando assim os efeitos no envelhecimento, na inflamação e no câncer (SALEHI et al., 2018).

Por este motivo viu-se a necessidade de buscar um tratamento que agisse de forma sistêmica a fim de reverter ou minimizar tais problemas (SCHMIDT et al., 2015). Nesse intuito viu-se nos agentes antioxidantes uma alternativa para a prevenção ou até mesmo tratamento para algumas patologias.

1.6.1 **Classificação dos antioxidantes**

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação: primários, secundários e desativadores de metais; quanto a sua origem: endógenos naturais enzimáticos e naturais não enzimáticos, sendo que os enzimáticos podem ser categorizados em sistema de defesa primário e secundário; e os antioxidantes naturais de origem alimentar (exógenos) (HES et al., 2019; PISOSCHI et al., 2016). Antioxidantes naturais são fundamentais para o bom funcionamento da defesa celular por este motivo viu-se a importância de estudos alguns desses compostos atrelados ao desenvolvimento ósseo.

2.1.1.1 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno; RES) é um um fitoestrogênio polifenólico não flavonoide que pode ser encontrado na natureza na composição de plantas como uvas vermelhas, amendoim, açaí, pinheiros, mirtilos, framboesas, amoras, nozes, pistache, cacau, algumas ervas medicinais asiáticas e também no vinho tinto (BITTERMAR AND CHUNG, 2015; CHE, 2016; LEE, 2016; KO et al., 2017; ASIS et al., 2019; MURGIA et al., 2019; RAUT et al., 2019, ZHOU et al., 2019).

A estrutura do RES tem em sua composição dois anéis fenólicos interligados por uma dupla ligação de estireno, sendo produzido desta forma 3,4', 5-tri-hidroxiestilbeno que pode ocorrer em duas isoformas, cis e trans (figura 4) (KO et al., 2017; MURGIA et al., 2019).

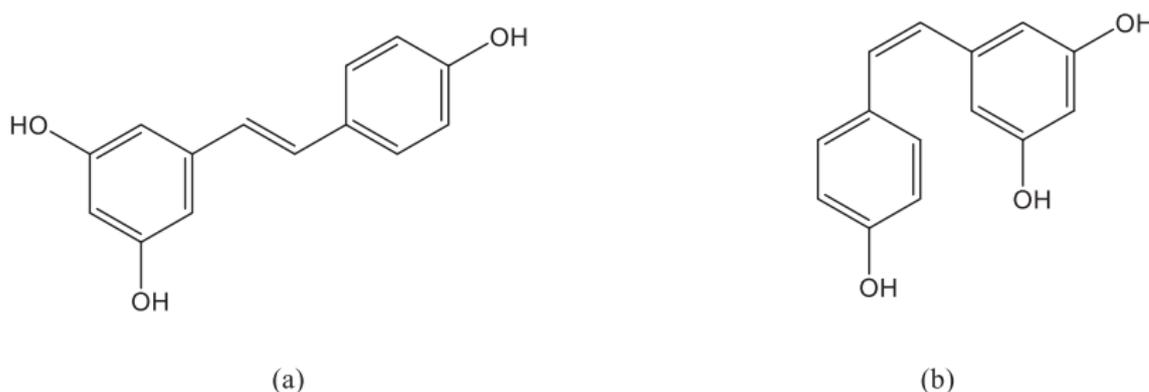


Figura 4: estrutura do Resveratrol (a) conformação trans-, (b) conformação cis- (TIAN AND LIU 2019).

A principal isoforma deste conjunto é a trans, sendo a mais estudada dentre as duas. Quando esta estrutura é submetida a calor ou radiações ultravioleta pode ser convertida na isoforma cis, sendo esta semelhante a estrutura do estrogênio sintético dietilestilbestrol. Por este motivo, RES foi classificado como um fitoestrogênio (KO et al., 2017).

A biossíntese de RES inicia-se com a reação, catalisada pela enzima estibene sintase, entre uma molécula de p-coumaroyl-CoA e três moléculas de malonyl-CoA (KO et al., 2017).

Existem análogos naturais tais como viniferinas, pterostilbene e piceid, além de análogos semi-sintéticos que sabem-se possuir benefícios farmacológicos semelhantes a RES natural (KO et al., 2017).

Ao ser consumido RES tem sua biodisponibilidade reduzida devido a modificações do tipo glucuronidação e sulfatação, por este motivo é pouco provável que o mesmo alcance concentrações séricas maiores do que 1 μM (BITTERMAR AND CHUNG, 2015).

Além da atuação de RES no aumento da expressão de enzimas antioxidantes, ele também pode atuar na diminuição da expressão e atividade da oxidase levando a inibição de ERO mediadas por NADPH oxidase. RES também estimula a biogênese mitocondrial, o que leva a uma redução na formação de superóxidos mitocondrial e a regulação positiva da síntese da enzima tetrahidrobiopterina guanosina trifosfato (GTP) ciclohidrolase I, levando a supressão da produção de superóxidos a partir do óxido nítrico sintetasa endotelial (MURGIA et al., 2019).

Dentre os efeitos benéficos deste polifenol estão a melhoria na atividade mitocondrial, proteção contra a obesidade e doenças relacionadas à obesidade, supressão de inflamação e crescimento de células cancerígenas, distúrbios cognitivos, proteção contra disfunção cardiovascular e remodelação óssea (BITTERMAR AND CHUNG, 2015; CHE et al., 2016; LEE et al., 2016; KO et al., 2017; ASIS et al., 2019; MURGIA et al., 2019; RAUT et al., 2019, ZHOU et al., 2019).

Em estudos primários envolvendo o uso de RES observou-se que o mesmo atuava na estimulação da proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em humanas (CHE et al., 2016; ZHOU et al., 2019).

No que diz respeito ao metabolismo ósseo, estudos demonstraram que o resveratrol age no processo de remodelação óssea ao passo que pode auxiliar na formação e atividade de osteoblastos ao mesmo tempo que inibe a diferenciação e a ação dos osteoclastos (CHE et al., 2016; LEE et al., 2016; BORSANI et al., 2018; RAUT et al., 2019).

Neste contexto, estudos in vitro mostraram que há um aumento na produção de fosfatase alcalina (ALP) dependendo da dose administrada de resveratrol. A

importância desse componente no processo da formação óssea deve-se ao fato de o mesmo atuar como um biomarcador para a diferenciação de osteoblastos, promovendo assim a diferenciação do mesmo (CHE et al., 2016; LEE et al., 2016).

RES também age sobre o SIRT1, viu-se que sua ativação, em trabalhos *in vitro*, desregulam a produção de pré-adipócitos e a diferenciação adipogênica, quando o mesmo inibe a transcrição de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese. Entre eles está o receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ) que quando inibido permite que haja o aumento da expressão de marcadores osteoblásticos tais como Runx2, osteocalcina (OCN), fosfatase alcalina (ALP) e osteopontina (LEE et al., 2016). Já sendo descrito que o resvetral promove osteogênese espontânea pela regulação positiva na expressão dos dois primeiros genes citados no atreiormente (MURGIA et al., 2019).

Apesar desses achados em estudos *in vitro*, em estudo *in vivo* os efeitos do RES não estão bem definidos quanto sua ação na remodelação óssea. Em trabalhos com animais foi observado que houve aumento na densidade mineral óssea epifisária e a inibição da diminuição de cálcio no fêmur de ratos ovariectomizados, em outros estudos observou-se que a suplementação com RES impediu o declínio da microarquitetura óssea de ratos idosos (CHE et al., 2016; LEE et al., 2016; ZHOU et al., 2019).

Apesar de tais achados ainda não está claro se RES realmente pode auxiliar no crescimento e acúmulo de massa óssea no início da vida de um indivíduo ou modular o metabolismo ósseo durante o envelhecimento precoce (LEE et al., 2016).

Foi demonstrado em estudos anteriores que RES pode atuar em diferentes mecanismos que participam da remodelação óssea (ASIS et al., 2019).

2.1.1.2 Ácido ascórbico

O Ácido L-Ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, é uma vitamina solúvel em água que pode ser encontrada em frutas frescas e vegetais. Ele é um micronutriente que participa da regulação do desenvolvimento, função e manutenção de vários tipos celulares do corpo, atuando na regulação da biossíntese do tecido

conjuntivo ou agindo como um agente antioxidante, já que apresenta um alto poder redutor (AGHAJANIAN et al., 2015; HART et al., 2015; CHIN AND IMA-NIRWANA, 2018). Ele pode agir como cofator nos processos de hidroxilases e enzimas monooxigenases envolvidas na síntese de colágeno, carnitina, neurotransmissores e hormônios (HART et al., 2015; CHIN AND IMA-NIRWANA, 2018). Além disso, seu papel é fundamental na função de leucócitos e no metabolismo de proteínas (HART et al., 2015).

Sua produção inicia-se com a formação de UDP-glicose a partir da D-glicose-1-fosfato e trifosfato de uridina (UTP). Desta forma a UDP-glicose passa por um processo de desidrogenação e perde o difosfato de uridina presente em sua composição, tornando-se então em D-glucuronato que em seguida é reduzido a L-gulonato que por sua vez é convertido enzimaticamente via gulonolactonase em L-gulono- γ -lactona. L-gulono- γ -lactona é convertida em AA via L-gulonolactona oxidase (GULO). Ao longo do processo evolutivo algumas espécies como capivaras, alguns morcegos e primatas e humanos perderam a capacidade de produção da vitamina C, devido a perda da capacidade de produção da GULO pelo fígado (AGHAJANIAN et al., 2015; HART et al., 2015; CHIN AND IMA-NIRWANA, 2018).

A vitamina C é um componente fundamental na síntese de colágeno, seu papel se deve a sua ação como cofator, influenciando na função da proteína do domínio da proli hidroxilase (PHD), esta enzima hidroxila prolinas que são fundamentais na formação e conformação da cadeia de colágeno (AGHAJANIAN et al., 2015; DePhillipo et al., 2018). Por este motivo viu-se que o AA é um modulador crítico na produção de colágeno o que vai além de seu efeito antioxidante (AGHAJANIAN et al., 2015).

O AA apresenta ação sobre vários tipos celulares ósseos. Ele atua positivamente na formação de ossos trabeculares, pela sua influência na expressão de genes da matriz óssea em osteoblastos (AGHAJANIAN et al., 2015).

Em estudos recentes com camundongos geneticamente modificados para deficiência de vitamina C, viu-se que o AA atua diretamente na regulação da transcrição de genes da via óssea. Nestes trabalhos notou-se que mudanças sutis em genes que regulam as vias de sinalização da vitamina C, podem influenciar negativamente a transcrição

de genes relacionados à maturação e função dos osteoclastos (AGHAJANIAN et al., 2015).

Além disso, foi observado que ele atua também na expressão de genes envolvidos na diferenciação de condrócitos e ainda regula o direcionamento de osteoblastos e também sua proliferação. Outros estudos *in vitro* mostraram que o AA estimula a deposição inicial da matriz extracelular colágena (AGHAJANIAN et al., 2015).

A diferenciação e proliferação de células condrogênicas e osteogênicas são reguladas de alguma forma por AA. Por exemplo, fatores de crescimento osteogênicos são sujeitos a regulação por AA, o fator de crescimento transformante (TGF- β), receptor de estrogênio e osteopontina (OPN) tem suas expressões aumentadas. Os três componentes citados anteriormente são reguladores fundamentais na formação óssea (AGHAJANIAN et al., 2015).

Tendo em vista tudo o que foi mencionado anteriormente, vê-se que o ácido ascórbico é de fundamental importância para a diferenciação osteogênica e condrogênica, visto que níveis abaixo do normal em organismos de vertebrados podem causar um distúrbio ósseo levando a fraturas espontânea, crescimento ósseo prejudicado e consolidação óssea prejudicada (AGHAJANIAN et al., 2015; LINDSEY, CHENG, MOHAN, 2019). Além disso, pesquisas apontam para a ação do AA no aumento da síntese de colágeno e na cicatrização do tecido musculoesquelético (DePHILLIPO et al., 2018). Por este motivo nota-se a importância do conhecimento dos mecanismos e vias reguladas pelo AA.

2.1.1.3. Curcumina

Curcumina (CUR) é um composto natural polifenólico presente no rizoma da curcuma (*Curcuma longa*). Ela possui em sua composição três curcuminoides: 77% de Curcumina, 17% de demetoxicurcumina e 3% de bisdemetoxicurcumina, sendo o primeiro com a maior atividade dentre os três.

Nos últimos anos, estudos tem demonstrado que CUR apresentou ações terapêuticas e atividades biológicas como a ação anti-infecciosa, antioxidantes, anti-inflamatória, trossupressor, anti-artrítico, quimiopreventivo e anticancerígeno. Além disso, a

Curcumina está associada à proteção ossea por inibir a osteoclastogênese afetando diretamente no ciclo da remodelação óssea aumentando assim, a densidade mineral e a microarquitetura óssea em estudos utilizando modelos animais e em pacientes com osteoporose (ROHANIZADEH, DENG AND VERRON, 2016; AHMED et al. 2019; LIANG et al., 2020).

1.7 DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

O osso é um tecido complexo metabolicamente e apresenta alta capacidade de reparação, porém, mesmo com estas qualidades, existem quadros clínicos onde o metabolismo ósseo não é capaz de promover sua reparação de forma espontânea. Visto isso, pesquisas têm buscado técnicas e estratégias diferenciadas que possam auxiliar na melhora de lesões ósseas ou na regeneração óssea retardada (BARBALHO et a., 2019).

O osso é um tecido conjuntivo que apresenta componentes inorgânicos e orgânicos. Em sua parte inorgânica, pode-se observar uma matriz mineralizada composta por hidroxiapatita que é formada por sais de cálcio e fosfato. Já a parte orgânica é formada por colágeno tipo I, proteoglicanos e outras proteínas (BARBALHO et al., 2019; DATTA et al., 2018). Além disso, existem três tipos celulares que predominam na estrutura óssea: dentre as células osteogênicas encontram-se os osteoblastos e osteócitos; os osteoclastos que são classificados como células de reabsorção e as células do tecido conjuntivo e as de defesa como os fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, linfócitos, monócitos e eosinófilos (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2010; ALLGROVE and SHAW, 2009).

1.7.1 Início do desenvolvimento esquelético

A primeira etapa do desenvolvimento esquelético inicia-se com a condensação das células mesenquimais indiferenciadas nos formatos e posições que posteriormente serão ocupadas pelos componentes do esqueleto. Após esta etapa as células condensadas passam pelo processo de diferenciação condrocítica que por sua vez passam a expressar colágeno tipo IIb, IX, XI e outros genes que ajudam a compor a matriz celular óssea. Os condrocitos já diferenciados passam por um novo processo

de diferenciação que resulta em uma hipertrofia do mesmo onde inicia-se a expressão de colágeno tipo X e diminuição do colágeno tipo IIb.

As células hiperproliferadas são envolvidas gradativamente por matriz calcificada, favorecendo assim a propagação de vasos sanguíneos vindos da região periférica do esqueleto. Esta etapa do desenvolvimento é em parte orquestrada por VEGF e metaloproteinases, como a MMP9/Gelatinase B. Além desta função o VEGF também é responsável por recrutar os osteoclastos, que são originados em compartimentos hematopoiéticos.

Ao passo que ocorre difusão vascular, os condrócitos hipertrofos sofrem apoptose dando lugar aos osteoblastos, que assim como os condrócitos são originados de precursores mesenquimais, são eles que passam a depositar colágeno tipo I que é o maior constituinte da matriz extracelular óssea.

A partir daí os condrócitos são restritos a zonas como a placa de crescimento que juntamente com os osteoblastos regem o crescimento osseo longitudinal.

Mesmo com todo este processo de ossificação, algumas partes do esqueleto não nunca sofrem ossificação e apresentam apenas condrócitos não hipertrofos, como é o caso da cartilagem costochondral das costelas.

Todo esse processo descrito anteriormente é denominado ossificação endocondral. Porém existe também o processo de ossificação intramembranosa que ocorre nos ossos do crânio e da clavícula. Tal mecanismo é devido a diferenciação das células mesenquimais diretamente em osteoblastos, pulando assim a formação dos condrócito (WAGNER and KARSENTY, 2001).

1.7.2 Os três principais tipos celulares

Como visto anteriormente, os principais tipos celulares que compõem os ossos: osteoblastos, osteócitos e osteoblastos. Com a fase do desenvolvimento finalizada, tais células apresentam funções que acompanham o indivíduos ao longo da vida.

Os osteoblastos são células derivadas de células-tronco mesenquimais pluripotentes indiferenciadas. Eles são responsáveis pela formação óssea, sintetizando e secretando a matriz orgânica do osso, sendo também os responsáveis pelo armazenamento de minerais e o revestimento de grande parte das superfícies ósseas (DATTA et al., 2018).

Os osteócitos surgem a partir de alguns osteoblastos que sofrem diferenciação, e que por sua vez param de produzir matriz orgânica. Eles então passam a ser encapsulados dentro de lacunas de osteóides em camadas concêntricas. Este novo tipo celular então se interconectam por processos dentríticos por meio de canaliculos lateral e internamente ao osso, possibilitando assim sua participação no revestimento ósseo (RIANCHO, 2011; ALLGROVE and SHAW, 2009). Além disso, os osteócitos presentes na matriz óssea regulam parcialmente a ativação da remodelação óssea quando respondem a estímulos bioquímicos ao ser detectado estresse mecânico sobre o osso (BARBALHO et al., 2019; DATTA et al., 2018; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2010).

Os osteoclastos são grandes células multinucleadas encontrados em torno das superfícies ósseas que estão em processo de reabsorção. Seus precursores partilham a mesma linhagem hematopoiética que os macrófagos (ALLGROVE and SHAW, 2009). A função dos osteoclastos é reabsorver o tecido ósseo. Eles secretam íons hidrogênio, colagenases e hidrolases. Tais enzimas, que são expressas nesse tipo, celular carregam a secreção de HCL para digerir a matriz mineral óssea e dissolver os cristais de cálcio presentes na parte inorgânica do osso. (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2010; WAGNER and KARSENTY, 2001; RIANCHO, 2011)

Mediante as informações acima, é perceptível que os osteoblastos têm a função de formação óssea e os osteoclastos de reabsorção do mesmo. Estes dois tipos celulares trabalham de forma coordenada para promover a remodelagem, o crescimento e reparo ósseo. Para que estas três funções sejam realizadas de forma coordenada é necessário que o funcionamento de cada tipo celular seja realizado de forma correta (DATTA et al., 2018).

1.7.3 A composição histológica

Na composição esquelética encontram-se os ossos longos e os ossos chatos. Histologicamente, pode-se dividir os ossos em cortical ou compacto com a estrutura densa e ordenada e os ossos esponjosos ou trabeculares com estrutura irregular e menos compacta (ALLGROVE; SHAW, 2009).

Pode-se encontrar o cortical nas hastes de ossos longos e na superfície de ossos planos. Este tipo ósseo se organiza de forma concêntrica ao redor dos canais do sistema Haversiano (dentro de cada camada contém osteócitos). Além disso, em sua composição também são encontrados vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (ALLGROVE; SHAW, 2009; DATTA et al., 2018).

Os ossos trabeculares formam as extremidades de ossos longos e o interior de partes dos ossos chatos. Ele tem aparência de favo de mel por apresentar conexões entre placas e barras denominadas trabéculas que estão alinhadas a linhas de tensão que proporcionam um aumento considerável de sua força (DATTA et al., 2018).

Além da estrutura óssea, outro componente importante são as fibras de colágeno que estão dispostas em uma orientação que proporciona a formação do osso lamelar, onde no osso trabecular elas encontram-se paralelas umas às outras e no cortical organizam-se de forma concêntrica (DATTA et al., 2018; RIANCHO; DELGADO-CALLE, 2011).

Geralmente os ossos tem uma cavidade medular que são ossos trabeculares sobrepostos a uma camada de osso cortical, sendo esta última apresentando uma camada de membrana denominada perióstio que por sua vez tem duas camadas: (1) camada fibrosa externa e (2) camada externa com potencial osteogênico e onde o processo de aposição periosteal ocorre. O córtex por sua vez também apresenta uma camada interna conhecida como endóstio que é por onde o osso apresenta uma tendência de sofrer reabsorção. Os osteoclastos e os osteoblastos estão presentes no endóstio e no perióstio onde trabalham coordenadamente para promover a remodelação, crescimento e reparo ósseo (DATTA et al., 2018).

1.7.4 A remodelação óssea

O tecido ósseo é fortemente calcificado, porém não um tecido inerte. Ele passa por um processo contínuo de remodelação (figura 5). Tal processo permite que em torno de 10% do esqueleto seja renovado por ano (ALLGROVE; SHAW, 2009; RIANCHO; DELGADO-CALLE, 2011).

A remodelação óssea dura em torno de 3-6 meses e inicia-se com estímulos mecânicos ou químicos, após o estímulo a superfície óssea é retraída, a membrana subjacente é removida por i,a metaloproteinase. Em seguida os osteoclastos são recrutados para a superfície óssea em questão e alí fundem-se e tornam-se multinucleados tornando-se ativos e digerindo o osso que se encontra abaixo dele. Após este processo osteoblastos são recrutados para promover a reposição na cavidade formada. Eles por sua vez formam osteóides que em seguida são calcificados. Este processo é essencial para a manutenção das funções normais do esqueleto (DATTA et al., 2018; ALLGROVE; SHAW, 2009; RIANCHO; DELGADO-CALLE, 2011).

E por este motivo viu-se a importância de estudo de substâncias que possam auxiliar no processo de remodelação óssea.

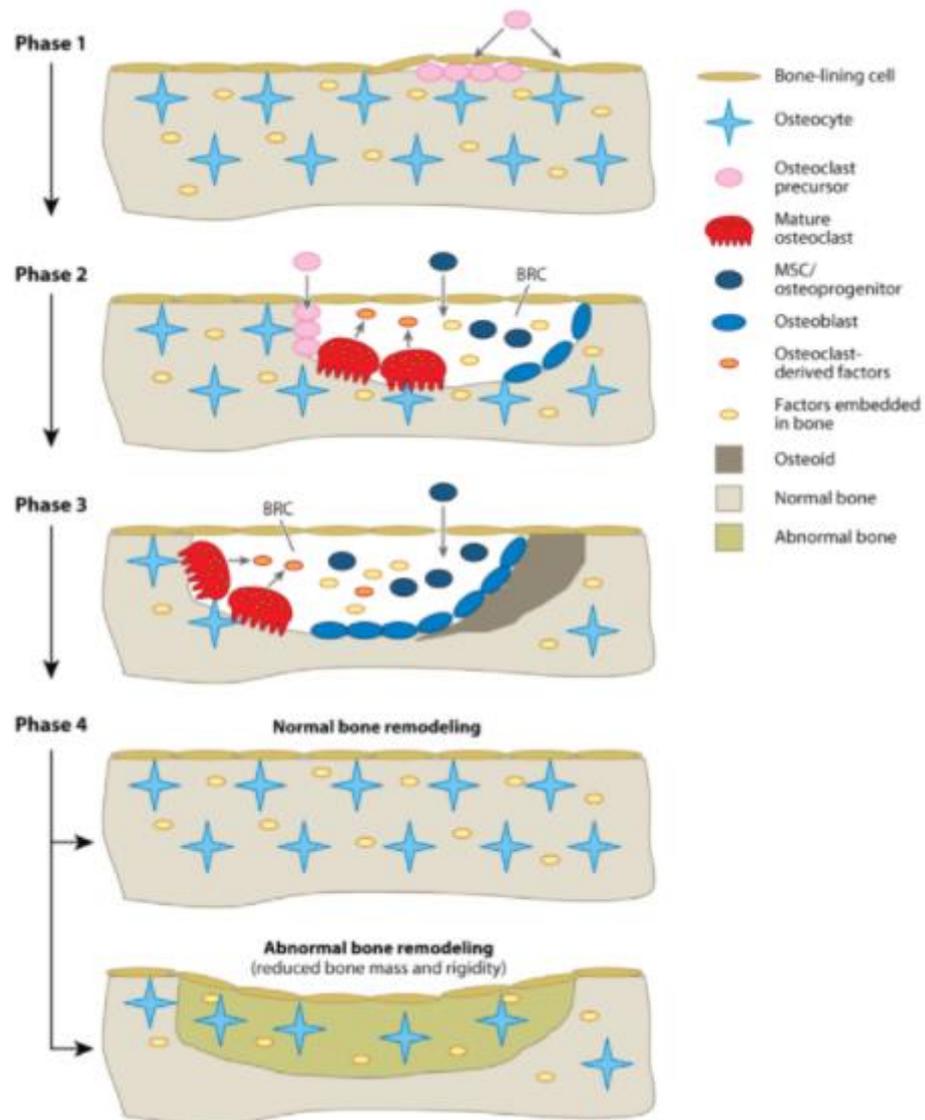


Figura 5: Fases da remodelação óssea e seus componentes (FENG; MCDONALD, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de mutações da Osteogenesis Imperfecta de pacientes do estado do Espírito Santo/Brasil e verificar se substâncias antioxidantes são capazes de promover ações benéficas relacionadas a melhora da proliferação celular em cultura de células tronco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o padrão de mutações de pacientes com Osteogenese Imperfeita do estado do Espírito Santo/Brasil.
- Avaliar se as células obtidas de tecido adiposo possuem a plasticidade de células tronco mesenquimais;
- Avaliar se os antioxidantes selecionados possuem grau de toxicidade nas culturas de células tronco mesenquimais comprometendo a valibilidade celular;
- Avaliar se os antioxidantes selecionados estimulam a proliferação celular nas culturas de células tronco mesenquimais;

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRAS

Para o estudo de caracterização do padrão de mutações de *Osteogenesis Imperfecta* foram coletados sangue periférico e dados clínicos de pacientes atendidos no Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES, centro de referência em tratamento para *Osteogenesis Imperfecta*. Foram coletados 10 mL de sangue periférico de 29 pacientes não consanguíneos e 100 controles normais (indivíduos que não apresentavam sintomas de OI) para extração de DNA e investigação das mutações relacionadas à OI.

Para o estudo de antioxidantes foram coletadas amostras de tecido adiposo obtidas de cirurgias ortopédicas com indicação médica prévia sem que houvesse prejuízo ao paciente de 94 indivíduos atendidos no Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES. Por deficiência na infraestrutura de armazenamento das amostras e/ou contaminação das culturas foram perdidas amostras de 93 indivíduos. Foi utilizada uma amostra controle (indivíduos que não tinham sintomas clínicos de OI). As amostras foram coletadas com materiais adequados e por profissionais qualificados do Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES. A execução dos experimentos foi realizada no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM/ UFES).

Somente foram incluídos na pesquisa os indivíduos que concordaram em participar do estudo por meio de termo de consentimento de livre e esclarecido e termo de consentimento. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob o número do parecer CAAE: 2.171.595.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES

O Delineamento experimental da pesquisa sobre caracterização de mutações envolveu coleta de sangue periférico, extração de DNA e análise de mutações. As amostras foram inicialmente estudadas por triagem de mutações por meio da técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) para os genes *COL1A1*,

COL1A2, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPPINF1* e *FKBP10*. Pacientes sem diagnóstico molecular conclusivo foram posteriormente reavaliados por um painel de NGS contendo os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* e *SP7*. Na etapa final da pesquisa, pacientes sem diagnóstico conclusivo foram analisados para os genes *WNT1* e *IFITM5* por sequenciamento de Sanger. Todas as mutações identificadas foram validadas por sequenciamento direto de Sanger.

4.2.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA a partir de sangue periférico foi seguido o seguinte protocolo: o DNA foi extraído de 5mL de sangue periférico de acordo com o protocolo de Miller et al., 1988.

4.2.2 Amplificação do DNA

Os exons dos genes estudados foram amplificados pela técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), utilizando primers gerados pelo programa Primer3. As reações de PCR de cada exon foram padronizadas em termociclador. Pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida, verificou-se o sucesso da padronização da reação de cada exon. O gel de poliacrilamida 7% foi submetido a 250V, por cerca de 2 horas. O resultado em gel de poliacrilamida foi visualizado pela técnica de coloração por nitrato de prata. O objetivo da técnica era confirmação da presença de uma única banda do tamanho esperado.

4.2.3 Next Generation Sequencing

Para o *Next Generation Sequencing* (NGS) foram utilizados 5uL de DNA a 100 ug/uL dos pacientes. A plataforma de captura de genes utilizada continha 460 genes nos quais estavam incluídos os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* e *SP7* relacionados com Osteogênese Imperfeita.

A partir do DNA dos pacientes foi feito o preparo das bibliotecas customizadas no painel *Nextera – Illumina*. Após a amplificação da biblioteca, a mesma foi validada por

meio de dois métodos utilizados para quantificar e verificar o tamanho da biblioteca. Primeiro foi feito por *Bioanalyzer* com o Kit *High Sensivity DNA kit* e posteriormente por Q-PCR com o kit *KAPA Library Quantification Kit* no equipamento *Real Time LighCycler* da Roche, conforme recomendado pelo próprio fabricante.

Validadas as amostras o sequenciamento se deu através do equipamento *MiSeq Illumina* que apresentava 600 ciclos (2x300) e cobertura média de 120X para as 22 amostras.

No que se refere à análise de dados, para encontrar *SNPs* e *indels* foi utilizado o *BWA* para realizar o alinhamento das sequências e para o realinhamento das mesmas utilizou-se o *Picard* e o *GATK* para gerar a lista de *SNPs*.

Como controles foram utilizados dados genéticos de indivíduos fornecidos pelo grupo colaborador da Universidade de São Paulo (USP).

Após a análise das amostras, quando encontradas alterações preditas como patogênicas, tais amostras eram validadas por meio do Sequenciamento de Sanger.

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o laboratório de Genética do Desenvolvimento e o Genoma Humano da Universidade de São Paulo com a técnica Meire Aguenta sob a supervisão das professoras Maria Rita Passos-Bueno e Mayana Zatz.

4.2.4 Purificação, sequenciamento e análise dos resultados

As amostras alteradas em gel foram purificadas com a enzima de purificação *ExoProStar 1-Step* da *GE Healthcare Life Sciences* de acordo com as especificações do fabricante. As reações de sequenciamento foram conduzidas com o *BigDYE Terminator KIT APPLIED BIOSYSTEMS*, de acordo com as especificações do fabricante. O produto de PCR pré-sequenciamento foi precipitado pela técnica de Isopropanol/Etanol. Os fragmentos alterados foram sequenciados no sequenciador automático *ABI PRISM® 3130XL GeneticAnalyzer /HITACHI*, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (trabalho em colaboração) e os resultados foram comparados às sequências referências disponíveis on-line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.3 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

O delineamento experimental da pesquisa sobre avaliação de antioxidantes em cultura envolveu coleta de tecido adiposo e estabelecimento da cultura celular para obtenção de células-tronco mesenquimais. Para confirmação de que as culturas apresentavam células-tronco mesenquimais uma alíquota de células de cada cultura estabelecida foi diferenciada em células dos tecidos ósseo, adiposo e conjuntivo, experimento realizado em triplicata para cada cultura diferenciada. Foram utilizadas colorações específicas para confirmar que estas culturas apresentavam células com características destes três tecidos. Posteriormente, as culturas iniciais de células-tronco mesenquimais foram tratadas em triplicatas com os antioxidantes Resveratrol Sigma Aldrich®, Ácido Ascórbico Sigma Aldrich® e Curcumina Sigma Aldrich® em concentrações diferentes. As células tronco tratadas foram avaliadas quanto a viabilidade celular por meio da técnica de MTT.

4.3.1 Processamento do tecido adiposo para estabelecimento de cultura celular

Para a preparação e o desenvolvimento da cultura de células a partir de um fragmento do tecido adiposo foi utilizado o protocolo de Zuk et al., 2002. O fragmento de tecido adiposo coletado foi lavado extensivamente com tampão, phosphate-buffered saline (PBS). Após essa etapa o tecido foi fragmentado logo após foram incubadas overnight por 37°C/5% CO₂ em meio contendo 89% DMEM, 10% Soro fetal Bovino (SFB), 1% de antibióticos e antimicóticos. Após realizada a cultura primária a partir do tecido coletado, as células foram expandidas, utilizando as mesmas condições citadas anteriormente.

Estabelecida a cultura celular foram realizadas as demais etapas da pesquisa. Para confirmar que a cultura obtida continha células-tronco mesenquimais, foram realizadas diferenciações em células dos tecidos ósseo, adiposo e conjuntivo em triplicatas em uma alíquota das culturas, conforme descrito a seguir.

4.3.2 Diferenciação osteogênica

As linhagens celulares foram semeadas numa densidade de 500 células/poço em placas 35x10mm. Para cada linhagem foram realizadas 3 repetições. As células foram cultivadas utilizando-se o meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,2 mM de ácido ascórbico 10^{-8} M de dexametasona e 10mM de glicerolfosfato. A cultura foi mantida por 3 semanas, renovando-se o meio a cada 3 dias. Após este período as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com Vermelho de Alizarina.

4.3.3 Diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica foi realizada com o StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit Gibco™, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto foram plaqueadas 5.000 células/poço em triplicada mais um poço de controle da diferenciação em uma placa de 24 wells. Atingida a confluência de 60-80% iniciou-se a diferenciação, sendo o controle da diferenciação mantido com meio de cultivo padrão. O meio foi trocado a cada 3 dias durante 7 a 14 dias. Após este período foram retirados os meios de cultivo e diferenciação e as células lavadas com PBS 1X e fixadas com formaldeído 10% e coradas com Oil Red.

4.3.4 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada com o StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit Gibco™, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto foi realizada a diferenciação a partir de cultura de micromasas, onde foi necessário obter $1,6 \times 10^7$ por mL. Para esta metodologia foram feitas 3 gotas de 5µL em cada well em triplicata mais um well para controle da diferenciação em uma placa de 24 wells. Ao término do plaqueamento, as células foram levadas à incubadora por volta de 2 horas para que a micromassa fosse fixada. Após este período foi adicionado o meio de diferenciação na triplicata, sendo o controle da diferenciação mantido com meio de cultivo padrão. As trocas dos meios foram realizadas a cada 3 dias em torno de 14 dias. Após este período as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com azul de toluidina.

4.4 TRATAMENTO DAS CULTURAS À AGENTES ANTIOXIDANTES

Para a selecionar as melhores concentrações de Resveratrol, Ácido Ascórbico e Curcumina em cultura foram testadas três concentrações diferentes de cada um dos antioxidantes.

Para o Resveratrol foram utilizadas as concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$. As culturas foram tratadas com resveratrol por 72hs. Foi realizada a avaliação de viabilidade celular após 24hs, 48hs e 72hs de exposição.

As concentrações de 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram utilizadas para análise do Ácido Ascórbico. As culturas foram tratadas por 72hs. Foi realizado o teste de viabilidade celular após 24hs, 48hs e 72hs de exposição ao Ácido Ascórbico.

Para a Curcumina foram usadas as concentrações de 0,3, 0,5 e 0,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$. As culturas foram tratadas com este composto por 24hs. Em seguida o meio contendo tal componente foi retirado e substituído por meio suplementado sem Curcumina. Logo após esta etapa foi realizada a avalia de viabilidade celular.

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico por MTT

Esta metodologia, realizada primeiramente por Mosmann, 1983, é baseada na metabolização do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Invitrogen™, pelas mitocôndrias das células viáveis e auxilia na identificação de compostos que provocam morte celular em cultura.

Foram plaqueadas 2.000 células/well para cada indivíduo estudado em três placas de 96 wells com meio de cultivo em triplicatas. A metodologia de MTT foi realizada após tratamento das culturas com os antioxidantes da seguinte forma: foi removido o meio de cultivo e o meio contendo os antioxidantes e adicionado 10 μL de MTT mais 90 μL de meio F12 em cada well com células. A placa de cultura foi envolvida em papel alumínio e incubada a 37°C por 4 horas. Após a incubação o meio contendo MTT foi removido e acrescentado 100 μL de DMSO em cada well. A placa foi incubada

novamente envolta em papel alumínio por uma hora. Após este período a placa foi submetida ao espectrofotômetro em uma absorvância de 570nm.

Feita a leitura, os dados foram trabalhados realizando-se as médias e porcentagens das células viáveis para cada concentração dos antioxidantes pela seguinte fórmula $(\%) = (A_{\text{tratado}} \times 100) / A_{\text{controle}}$ onde A_{tratado} é a média da absorvância de uma dada concentração em que as células foram expostas e A_{controle} é a média da absorvância das células mantidas somente com meio suplementado sem antioxidante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1

Artigo referente ao tópico sobre caracterização do padrão de mutações da OI em pacientes do ES. Este artigo foi publicado na revista Genetics and Molecular Biology (GMB) que possui Qualis B1 segundo classificação da Capes e Fator de Impacto 2.584. Segue o artigo na integra.



Osteogenesis imperfecta in Brazilian patients

Maira Trancozo^{1,2*}, Marcos V.D. Moraes^{1,2*}, Dalila A. Silva^{1,2}, Jéssica A.M. Soares¹, Clara Barbirato¹, Márcio G. Almeida¹, Lígia R. Santos^{1,2}, Maria R. G. O. Rebouças³, Akel N. Akel Jr³, Valentim Sipolatti³, Vanda R. R. Nunes³, Flavia I. V. Errera^{2,4}, Meire Aguenta⁵, Maria R. Passos-Bueno⁵ and Flavia de Paula^{1,2} 

¹*Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.*

³*Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória, ES, Brazil.*

⁴*Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brazil.*

⁵*Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.*

Abstract

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a heterogeneous genetic disorder characterized by bone fragility and fracture. Mutations in 20 distinct genes can cause OI, and therefore, the genetic diagnosis of OI is frequently difficult to obtain because of the great number of genes that can be related with this disease. Studies that report the most frequently mutated genes in OI patients can help to improve molecular strategies for diagnosis of the disease. In order to characterize the mutation profile of OI in Brazilian patients, we analyzed 30 unrelated patients through SSCP screening, NGS gene panel, and/or Sanger sequencing for the 11 most frequently mutated genes in the database of mutations, including *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5*. Disease-causing variants were identified in *COL1A1*, *COL1A2*, *FKBP10*, *P3H1*, and *IFITM5*. A total of 28 distinct mutations were identified, including seven novel changes. Our data show that the analysis of these five genes is able to detect at least 95% of causative mutations in OI disorder from Brazilian population. However, it has to be taken into considerations that distinct populations can have different frequencies of disease-causing variants. Hence, it is important to replicate this study in other groups.

Keywords: NGS gene panel, *COL1A1*/*COL1A2* genes, *FKBP10* gene, *P3H1* gene, *IFITM5* gene.

Received: February 9, 2018; Accepted: October 3, 2018.

Introduction

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a heterogeneous group of connective tissue syndromes characterized by abnormal bone fragility that leads to fractures and skeletal deformities. The prevalence of OI is estimated to be 1/15,000 (Folkestad *et al.*, 2016). Because of its wide clinical variability, patients can also develop short stature, dentinogenesis imperfecta, blue sclera and hearing loss (van Dijk *et al.*, 2010). The phenotypic spectrum of OI may overlap with other skeletal diseases, which makes the establishment of a precise diagnosis based on clinical, radiological and genetic investigations extremely difficult. Based on clinical diagnosis, including pre- and postnatal severity of bone fragility, the traditional classification distinguishes four phenotypic groups (OI types I to IV). OI type I is the mildest

phenotype, OI type II is lethal in the neonatal period, OI type III is the most severe form compatible with postnatal survival, and OI type IV represents a moderate form of severity (Sillence *et al.*, 1979). However, an expanded classification has been suggested based on the phenotype and the mutated gene (Marini *et al.*, 2017).

OI-like syndromes with a dominant or recessive pattern of inheritance can be associated with at least twenty genes (Dagleish, 1997, 1998; Kang *et al.*, 2017). A large frequency of OI cases that segregate in an autosomal dominant pattern are due to heterozygous mutations in the structural genes coding for the two procollagen chains, *COL1A1* (OMIM 120150) and *COL1A2* (OMIM 120160), that form type I collagen structure, the main protein of bone, tendons and cartilage (Van Dijk *et al.*, 2010). In addition, mutations in *IFITM5* (OMIM 614757), the gene encoding BRIL, a transmembrane protein enriched in osteoblasts during mineralization, are less frequent but are also related (Cho *et al.*, 2012; Semler *et al.*, 2012; Hanagata, 2016). Mutations in the *P4HB* gene (OMIM 176790) were also reported causing OI with an autosomal dominant inheritance (Rauch *et al.*, 2015).

Send correspondence to Flavia de Paula. Laboratório de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29.075-910 Vitória, ES, Brazil. E-mail: flapvit@yahoo.com.br

* These authors contributed equally to this work.

Those individuals who do not have a mutation in one of the structural collagen genes might carry mutations in genes with an autosomal recessive pattern. The number of genes discovered that may lead to recessive phenotypes have increased dramatically (Kang *et al.*, 2017; Marini *et al.*, 2017). Among them are the following: *CRTAP* (OMIM 605497), *P3H1* (OMIM 610339), *PPIB* (OMIM 123841), *SERPINH1* (OMIM 600943), *FKBP10* (OMIM 607063), *SERPINF1* (OMIM 172860), *SP7/OSX* (OMIM 606633), *PLOD2* (OMIM 609220), *BMP1* (OMIM 614856), *TMEM38B* (OMIM 615066), *WNT1* (OMIM 615220), *CREB3L1* (OMIM 616229), *SPARC* (OMIM 616507), *MBTPS2* (OMIM 300294), *SEC24D* (OMIM 607186). Mutations in these genes can cause abnormal collagen post-translational modification, collagen processing and crosslinking modification, bone mineralization, or osteoblast differentiation and function (Marini *et al.*, 2017). Recently, an X-linked gene, the *PLS3* (OMIM 300131), was included in the OI variant database (Dalglish, 1997,1998).

According to the best practice guidelines for laboratory diagnosis of OI, Sanger sequencing of relevant genes is the gold standard (van Dijk *et al.*, 2012). Given the large number of suspected genes linked to OI and its phenotypic heterogeneity, Sanger sequencing of various genes might increase the sensitivity of molecular diagnosis of a disease. However, the procedure is not only expensive but also laborious and very time-consuming. The emergence of new technologies for high-throughput capture and the possibility of including all causative-OI genes in a sequencing panel has made next-generation sequencing (NGS) one of the most promising techniques for molecular diagnostic purposes (Sule *et al.*, 2013; Árvai *et al.*, 2016).

Herein, we present the results of the analysis of 30 individuals with typical OI phenotype from the Brazilian population through single strand conformation polymorphism (SSCP) screening, NGS gene panel, and Sanger sequencing for the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes.

Material and Methods

Subjects

A total of 30 patients with clinical and radiological diagnoses of OI were included in this study. All patients were selected from Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória, ES, in southeastern Brazil, with approval by its Ethics Committee. In most of the cases we could not collect DNA samples from other family members. The participants of this study were recruited from 2006 to 2012. All participants gave informed consent to participate in this study. Fifteen patients previously described by our group (Barbirato *et al.*, 2009, 2015, 2016; Moraes *et al.*, 2012) were re-analyzed in this study.

Mutational analysis

The Osteogenesis Imperfecta Variant Database contains a compilation of genetic variants from 20 OI-related genes (Dalglish, 1997, 1998). In the present work, we selected the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes. We chose these as they were reported as being the most prevalent with causative-OI mutations (Dalglish, 1997, 1998).

DNA samples were collected from peripheral blood and extracted using the Miller *et al.* (1988) protocol. PCR of exons and exon/intron boundaries was performed in genomic DNA followed by single strand conformation polymorphism (SSCP) screening on polyacrylamide gel and Sanger sequencing of abnormal fragments for the analysis of the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1* and *FKBP10* genes until 2013. As the NGS gene panel can detect genetic variations with higher sensitivity than SSCP screening, we re-analyzed patients for whom the molecular diagnosis was not conclusive by May 2015 through an NGS panel that contained the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* and *SP7* genes. After July 2015, patients without conclusive molecular results were analyzed through direct Sanger sequencing for the *WNT1* and *IFITM5* genes.

For SSCP screening, all exons of analyzed genes and their flanking regions were screened using 5-7% acrylamide gels and the commercial version MDE[®] Mutation Detection Enhancement Gel (Lonza Group Ltd., USA) to improve sensitivity. Fragments with abnormal patterns on SSCP gels were analyzed after silver staining, and Sanger sequencing was performed in an ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The primers used for the *COL1A1* gene were previously described by Körkkö *et al.* (1998); those used for *P3H1*, *CRTAP* and *PPIB* were reported by Barbirato *et al.* (2015). The primers for *COL1A2*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *WNT1* and *IFITM5* are described in the Tables S1-S6.

For the NGS gene panel, we used a customized panel that analyzed segments of exons for the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* and *SP7* genes. This analysis was performed with a NEXTERA kit (Illumina, USA), which was used to prepare the sample library and to capture genes. A total of 10 ng DNA/sample was used for the target enrichment step. For quantification of the samples and to verify the length of the library, we used the High Sensitivity DNA kit in an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Quantitative PCR was performed by means of the KAPA Library Quantification Kit in a Real Time LightCycler[®] System (Roche, DE). The captured libraries were sequenced with a MiSeq Sequencer (Illumina, USA).

NGS sequence reads were aligned to the human reference genome (hg19, GRCh37) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, version 0.6.1) (Li and Durbin, 2009). To verify single-nucleotide variant (SNV) substitutions and

small indels (INDELs), variants were called with SAM tools (version 0.1.18), Picard tools (version 1.60) and Genome Analysis Toolkit (GATK, version 1.5.21) (Li *et al.*, 2009; McKenna *et al.*, 2010). Genotypes were called at all positions with high-quality sequence bases and filtered to retain SNVs and insertion-deletions with Phred-like quality scores of at least 20.

The pipeline used in NGS gene panel for the analysis of the variants used the following filters: minor allele frequency in 1000 genomes < 0.001 (MAF_1000G < 0.001); eliminated variants 3 annotated as downstream/ upstream/ intergenic/ within non-coding genes; not in dbSNP; minimum coverage 30 reads (DP≥30) and, predicted as pathogenic by more than one prediction program (Shift +Polyphen).

Sanger sequencing validated all mutations identified by NGS gene panel and SSCP screening.

Results

This study comprised a total of 30 unrelated OI patients (16 males, 14 females), based on clinical and radiological diagnosis. A severe phenotype was observed in 37% of the patients (11/30), a moderate in 23% (7/30), and a mild one in 40% (12/30) of the total. Lethal OI cases were not included in this work. Isolated OI patients accounted for 67% (20/30) of the sample. Additionally, positive familial history was reported by 30% (9/30) of the patients. There were affected members in more than one generation according to the autosomal dominant pattern of inheritance in eight distinct families. We observed one family (P.26) that only reported affected siblings, suggesting an autosomal recessive pattern. The assessment of familial history was not available for patient P.11. Only one patient (P.2) reported consanguinity of her parents.

Disease-causing variants were identified in 97% (29/30) of the study patients. The initial SSCP screening and Sanger sequencing allowed the detection of mutations in 11 patients (seven mutations in the *COL1A1* gene, one change in the *COL1A2* gene, two genetic variants in the *P3H1* gene, and one mutation in the *FKBP10* gene).

In the subsequent analysis, the NGS gene panel was performed in 20 patients, including 18 patients for whom mutations were not identified and in two whose the results were not conclusive in the previous analysis. The NGS gene panel allowed the identification of mutations in 17 patients (seven pathogenic changes in the *COL1A1* gene, eight mutations in the *COL1A2* gene, pathogenic variants in two patients in *FKBP10* gene). The NGS gene panel also allowed the confirmation of a likely pathogenic *P3H1* gene variant previously detected by SSCP in heterozygosity in patient P.26. This gene was related to a recessive OI pattern, but the second mutation in this patient was not identified, neither by SSCP nor by the NGS gene panel. Sanger sequencing for the *IFITM5* gene identified a mutation in

one of the patients. The causative OI mutation was not detected in patient P.30.

Overall, a total of 28 distinct mutations were identified, including seven novel changes. Two variants were reported more than once in distinct families. The remaining 26 genetic variants were unique. In total, 14 mutations were found in the *COL1A1* gene, nine in the *COL1A2* gene, and one in the *IFITM5* gene. Four mutations were detected in the *FKBP10* gene. Two other unrelated patients carry mutations in the *P3H1* gene. No mutations were found in the *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *WNT1* or *SP7* genes in the studied sample. The main results are listed in Table 1.

We also re-analyzed through NGS gene panel and Sanger sequencing the status of seven genetic variants: i) the c.1812C > T (p.Pro604=) synonymous variant in the *P3H1* gene; ii) the c.1087A > G (p.Lys363Glu) missense change in the *P3H1* gene; iii) the c.558A > G (p.Ala186=) change in the *CRTAP* gene; the two following changes present in the *FKBP10* gene: iv) the c.590A > G (p.Lys197Arg) missense change; and v) c.1546G > A (p.Leu516Phe) variant; and the two following changes in the *SERPINF1* gene: vi) the c.18A > G (p.Leu6=) synonymous variation, and vii) c.21C > A (p.Leu7=) change, previously reported by our group (Barbirato *et al.*, 2015,2016). These variations were found in patients P.1, P.10, P.11, P.24, and P.27 who carry pathogenic known mutations (Table 1). The identification of these known pathogenic mutations in patients who carry these genetic variants suggests that these changes are rare non-pathogenic variants.

Discussion

In our study, we analyzed 30 unrelated OI patients for the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes through SSCP screening, NGS gene panel and Sanger sequencing. We identified pathogenic mutations in 97% of the sample, including seven novel changes. Eighty per cent of causative OI mutations were detected in genes related to autosomal dominant OI (*COL1A1*, *COL1A2* and *IFITM5* genes) and 17% in genes involved in autosomal recessive OI forms (*P3H1* or *FKBP10* genes). Because there are different genes related to OI, and there is a lack of hotspots of mutations in most populations, knowledge about the primarily mutated genes that cause OI in specific populations can improve the strategies of genetic diagnosis for this disease.

In the present work, the study of the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *FKBP10* and *IFITM5* genes, selected from among 20 other distinct genes that can cause OI, allowed the detection of genetic changes in at least 95% of our subjects, providing supporting to the hypothesis that these genes contain most of the mutations found among OI patients. We failed to identify mutations in one patient.

Table 1 - Genetic variations found in Osteogenesis Imperfecta patients.

Patient	Gene	Exon/Intron	Mutation (cDNA)	Mutation (protein)	Mutation type	Zygosity	OI phenotype	Familial	Novel	Mutation detection technique	OI type
P.1	<i>COL1A1</i>	Exon 8	c.608G > T	p.Gly203Val	Missense	Heterozygous	severe	No	No	NGS	III
P.2	<i>COL1A1</i>	Exon 13	c.887G > T	p.Gly296Val	Missense	Heterozygous	mild	Yes	Yes	NGS	I
P.3	<i>COL1A1</i>	Intron 16	c.1056+1G > A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No	SSCP	IV
P.4	<i>COL1A1</i>	Exon 17	c.1138G > T	p.Gly380Cys	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No	SSCP	I
P.5	<i>COL1A1</i>	Exon 18	c.1165G > T	p.Gly389Cys	Missense	Heterozygous	moderate	No	No	NGS	IV
P.6	<i>COL1A1</i>	Intron 27	c.1875+1G > C	Splice Site	Splicing	Heterozygous	severe	No	No	SSCP	III
P.7	<i>COL1A1</i>	Exon 32	c.2165G > C	p.Gly722Ala	Missense	Heterozygous	mild	No	Yes	NGS	I
P.8	<i>COL1A1</i>	Exon 37	c.2523delT	p.(Gly842Alafs*266)	Frameshift	Heterozygous	mild	Yes	No	NGS	I
P.9	<i>COL1A1</i>	Intron 37	c.2559+1G > A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	mild	Yes	No	SSCP	I
P.10	<i>COL1A1</i>	Exon 40	c.2750delG	p.(Gly917Aspfs*191)	Frameshift	Heterozygous	severe	Yes	Yes	SSCP	III
P.11	<i>COL1A1</i>	Exon 44	c.3162delT	p.(Gly1055Alafs*53)	Frameshift	Heterozygous	mild	N/A	No	NGS	I
P.12	<i>COL1A1</i>	Exon 45	c.3235G > A	p.Gly1079Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No	SSCP	I
P.13	<i>COL1A1</i>	Exon 45	c.3235G > A	p.Gly1079Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No	NGS	I
P.14	<i>COL1A1</i>	Exon 45	c.3239delC	p.(Pro1080Leufs*28)	Frameshift	Heterozygous	severe	No	Yes	SSCP	III
P.15	<i>COL1A2</i>	Intron 14	c.693+2T > C	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No	NGS	IV
P.16	<i>COL1A2</i>	Exon 16	c.739G > C	p.Gly247Arg	Missense	Heterozygous	moderate	No	No	SSCP	IV
P.17	<i>COL1A2</i>	Exon 34	c.2027G > A	p.Gly676Asp	Missense	Heterozygous	mild	No	No	NGS	I
P.18	<i>COL1A2</i>	Exon 38	c.2314G > A	p.Gly772Ser	Missense	Heterozygous	mild	No	No	NGS	I
P.19	<i>COL1A2</i>	Exon 38	c.2314G > A	p.Gly772Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No	NGS	I
P.20	<i>COL1A2</i>	Intron 40	c.2565+1G > A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No	NGS	IV
P.21	<i>COL1A2</i>	Exon 40	c.2458G > A	p.Gly820Ser	Missense	Heterozygous	severe	No	No	NGS	III
P.22	<i>COL1A2</i>	Exon 49	c.3278G > A	p.Gly1093Asp	Missense	Heterozygous	severe	No	No	NGS	III
P.23	<i>COL1A2</i>	Exon 49	c.3296G > C	p.Gly1099Ala	Missense	Heterozygous	severe	No	Yes	NGS	III
P.24	<i>IFITM5</i>	5'UTR	c.-14C > T	p.Met1ext-5	Start Codon	Heterozygous	severe	No	No	Sanger S	V
P.25	<i>P3H1</i>	Intron 5	c.1080+1G > T	Splice Site	Splicing	Homozygous	severe	No	No	SSCP	VIII
P.26	<i>P3H1</i>	Exon 14	c.2024G > T	p.Trp675Leu	Missense	Heterozygous	severe	Yes	No	SSCP/NGS	VIII
P.27	<i>FKBP10</i>	Exon 1	c.21dupC	p.Ser8Glnfs*67	Frameshift	Homozygous	moderate	No	No	NGS	XI
P.28	<i>FKBP10</i>	Exon 1 Intron 6	c.179A > C c.1063+2T > C	p.Gln60Pro Splice Site	Missense Splicing	Heterozygous Heterozygous	moderate	No	Yes	NGS	XI
P.29	<i>FKBP10</i>	Exon 5	c.831dupC	p.Gly278Argfs*95	Frameshift	Homozygous	severe	No	No	SSCP	XI
P.30	-	-	-	-	-	-	mild	No	-	-	-

N/A: Not available; NGS: next-generation sequencing gene panel; SSCP: single strand conformation polymorphism; Sanger S: Sanger sequencing

This likely occurred because this patient may carry pathogenic changes in a gene that was not analyzed in this study, or because the pathogenic variant is in a regulatory region that was not studied. When a causative OI mutation cannot be identified among the many genes studied, other genes must be analyzed to define the molecular diagnosis.

Bardai, *et al.* (2016), in a study from Canada that enrolled 598 OI individuals, proposed the division of patients into groups according to their phenotype to improve the identification of causative-OI mutations. In our sample, when we divided the patients using this parameter, all patients with a mild spectrum, and in whom the mutation was identified, showed mutations in the *COL1A1/COL1A2* genes. Bardai *et al.* (2016), also showed that 77% of patients with a moderate/severe spectrum carry mutations in the *COL1A1/COL1A2* genes, 9% of the patients share genetic changes in the *IFITM5* gene, and 12% of the patients carry mutations in genes related to a recessive OI pattern. The results of Bardai *et al.* (2016) suggest that the pathogenic changes are found mainly in *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *WNT1* and *FKBP10* genes among those related with recessive OI pattern. In our sample, we identified pathogenic changes related with recessive pattern only in *P3H1* and *FKBP10* genes.

The majority of causative-OI mutations identified were in the *COL1A1* gene, representing 47% (14/30) of all variants detected in this study, followed by 30% (9/30) in the *COL1A2* gene, 10% (3/30) in the *FKBP10* gene, 7% in the *P3H1* gene (2/30), and 3% (1/30) in the *IFITM5* gene. As reported in several works, 50% or more of the OI patients carry changes in the *COL1A1* gene, followed by the *COL1A2* gene (Zhang *et al.*, 2012; Lindahl *et al.*, 2015; Hoet *et al.*, 2016). These works also described that most of the pathogenic variants in the *COL1A1/COL1A2* genes are glycine substitutions. As expected, approximately 60% of the *COL1A1/COL1A2* mutations identified in our study were glycine substitutions, while 40% of the patients carry other types of genetic variations, including mainly changes to splice sites and frameshift mutations.

Genes involved with recessive OI forms of inheritance that were previously reported by our group (Barbirato *et al.*, 2015, 2016) were re-analyzed in this study. SSCP screening allowed to find the *P3H1* c.2024G > T (p.Trp675Leu) change in heterozygous state in patient P.26. The NGS gene panel confirmed the presence of this variant in heterozygosity. Mutations in the *P3H1* gene cause OI type VIII. In patient P.26, no other genetic change was found in any of the studied genes. The second pathogenic change in this patient may be localized in a non-coding region of the *P3H1* gene, which was not analyzed in this work. However, as we did not find a second change, we cannot exclude the fact that the causative-OI mutation can be in another *locus*.

The use of the NGS gene panel allowed the identification of two variants in patient P.28, these being the c.179A > C (p.Gln60Pro) missense change (exon 1) and the

c.1063+2T > C splicing site alteration (intron 6) in the *FKBP10* gene. Another change identified in the same gene by NGS methodology was the c.21dupC homozygous mutation detected in patient P.27. These three distinct mutations in the *FKBP10* gene are predicted to be pathogenic changes, according to *in silico* tools of mutation prediction present in the analysis of the NGS sequences. Mutations in the *FKBP10* gene cause OI type XI.

The *FKBP10* c.831dupC frameshift change and the *P3H1* c.1080+1G > T mutation, previously identified by our group (Barbirato *et al.*, 2015, 2016), are very well described in the literature (Fratzl-Zelman *et al.*, 2016; Caparros-Martin *et al.*, 2017). Therefore, they were re-analyzed only by Sanger sequencing. These homozygous changes were confirmed in patients P.29 and P.25, respectively. The *P3H1* c.1080+1G > T change has a carrier frequency of approximately 1/240 in the African American population. This mutation in homozygous state usually results in a perinatal lethal form of OI (Cabral *et al.*, 2007). In some populations, the carrier frequency of this allele is relatively high. As the carrier frequency in a population increases, the frequency of infants with recessively inherited OI due to homozygosity for one allele increases, as demonstrated by the homozygosity for *P3H1* c.1080+1G > T among West Africans and the presence of founder mutations in other distinct geographic endogamous groups (Pepin *et al.*, 2013). In our sample, this change was observed only once among the 30 unrelated OI patients. The number of patients studied for this rare change in our work is too small to infer their approximate frequency in our population.

The c.-14C > T change identified in one patient in our sample is a recurrent mutation in the *IFITM5* gene described in the literature (Liu *et al.*, 2016, Guan *et al.*, 2017). Bardai *et al.* (2016) found this mutation in 5% of the patients, and a very similar frequency was found in the patients from our sample. Mutations in the *IFITM5* gene cause OI type V, as reported in patients with predisposition to develop a hyperplastic callus after fractures or surgical intervention (Semler *et al.*, 2012). However, in our work the clinical team did not identify these changes prior to the genetic study.

The great number of techniques involving high-throughput sequencing becomes a challenge when characterizing the clinical status of variants with uncertain significance (VUS). The characterization of different VUS among distinct groups can aid in the interpretation of the clinical spectrum of rare variants. In the present study, we re-analyzed the following missense and synonymous VUS in the *P3H1*, *CRTAP*, *FKBP10* and *SERPINF1* genes: the *P3H1* c.1812C > T (p.Pro604=) variant; the *P3H1* c.1087A > G (p.Lys363Glu) change; the *CRTAP* c.558A > G (p.Ala186=) change; the *FKBP10* c.590A > G (p.Lys197Arg) missense change; the *FKBP10* c.1546G > A (p.Leu516Phe) variant; the *SERPINF1* c.18A > G (p.Leu6=) synonymous variation and the *SERPINF1* c.21C

> A (p.Leu7=) change. These variants were previously reported by Barbirato *et al.* (2015, 2016) using SSCP screening to analyze different causative OI-genes. In our study, we observed that these variations are present in patients who carry pathogenic known mutations in other genes, suggesting that these variants are non-pathogenic changes. Barbirato *et al.* (2015, 2016) failed to detect the pathogenic mutations in patients carrying these variants, probably, because of sensitivity and specificity limitations of the SSCP screening.

The presence of high consanguinity or a founder effect can change the prevalence of a disease among different populations, as described by Bardai *et al.* (2016), who found the majority of mutations to be in the *SERPINF1* and *CRTAP* genes among those who are related with a recessive pattern. Minillo *et al.* (2014) also found the same *SERPINF1* gene mutation in two unrelated Brazilian families, one of them with at least four generations of affected patients and reporting high consanguinity, supporting the hypothesis of a founder effect. In our study, mutations were identified neither in the *SERPINF1* or *CRTAP*, nor in the *PPIB*, *SERPINH1*, *WNT1* or *SP7* genes, suggesting that mutations in these genes are rare in the studied sample.

The identification of mutated genes and the differentiation between dominant and recessive autosomal forms in patients can provide the basis for accurate counseling regarding prognosis and reproductive purposes, allowing the prevention of new cases of the disease in the population. In this study, we analyzed 30 unrelated OI patients for mutations in the 11 most frequently mutated genes in the OI mutations database. Causative changes were found in 97% of the patients. Among these, 47% were in the *COL1A1* gene, 30% in the *COL1A2* gene, 10% in the *FKBP10* gene, 7% in the *P3H1* gene and 3% in the *IFITM5* gene. In one patient we found no disease-causing variants. The molecular diagnosis of OI becomes extremely difficult due to the presence of 20 distinct relevant genes. Hence, the study of the most frequently mutated genes in OI patients can help to improve molecular strategies of diagnosis for the disease. Our data show that the analysis of these five genes in OI Brazilian patients is able to detect at least 95% of the causative mutations. Nonetheless, distinct populations can have different frequencies of disease-causing variants, and hence, replication of this study in other groups is necessary for knowledge about the profile of OI mutations in distinct communities.

Acknowledgments

We value the assistance and technical support of the researchers at Núcleo de Genética Humana e Molecular – NGHM. We also thank the patients who participated in this research. This work was supported by CNPQ (MCTI), FAPES/Decit/SCTIE/MS, FACITEC, UFES and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

FP, FIVE and MRPB conceived and designed the study, MT, MVDM, DAS, JAMS, CB, MGA, LRS and MA conducted the laboratory experiments, MRGOR, ANAJ, VS and VRRN contributed with clinical data of the patients, FP, MT, MVDM and DAS analyzed the data, FP, MT and MVDM wrote the manuscript, LRS, FIVE and MRPB revised the manuscript, all authors read and approved the final version.

References

- Árvai K, Horváth P, Balla B, Tobiás B, Kató K, Kirschner G, Klujber V, Lakatos P and Kósa JP (2016) Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. *Sci Rep* 6:28417.
- Barbirato C, Almeida MG, Milanez M, Sipolatti V, Rebouças MRGO, Akel Jr AN, Nunes VR, Perrone AM, Zatz M, Louro ID *et al.* (2009) A novel COL1A1 gene-splicing mutation (c.1875+1G > C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res* 8:173–178.
- Barbirato C, Trancozo M, Almeida MG, Almeida LS, Santos TO, Duarte JCG, Rebouças MR, Sipolatti V, Nunes VR and Paula F (2015) Mutational characterization of the P3H1/CRTAP/CypB complex in recessive osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res* 14:15848–15858.
- Barbirato C, Trancozo M, Rebouças MR, Sipolatti V, Nunes VR and Paula F (2016) Analysis of FKBP10, SERPINH1, and SERPINF1 genes in patients with osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res* 15:gmr.15038665.
- Bardai G, Moffatt P, Glorieux FH and Rauch F (2016) DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. *Osteoporos Int* 27:3607–3613.
- Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S, Makareeva E, Kuznetsova NV, Rosenbaum KN, Tiffit CJ *et al.* (2007) Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet* 39:359–365.
- Caparros-Martin JA, Aglan MS, Temtamy S, Otaify GA, Valencia M, Nevado J, Vallespin E, Pozo AD, Castro CP, Calatrava-Ferreras L *et al.* (2017) Molecular spectrum and differential diagnosis in patients referred with sporadic or autosomal recessive osteogenesis Imperfecta. *Mol Genet Genomic Med* 5:28–39.
- Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, Lee G, Kim HN, Lee HR, Eom HH *et al.* (2012) A single recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes Osteogenesis Imperfecta Type V. *Am J Hum Genet* 91:343–348.
- Dalgleish R (1997) The Human Type I Collagen Mutation Database. *Nucleic Acids Res* 25:181–187.
- Dalgleish R (1998) The Human Collagen Mutation Database. *Nucleic Acids Res* 26:253–255.
- Folkestad L, Hald JD, Canudas-Romo V, Gram J, Hermann AP, Langdahl B, Abrahamsen B and Brixen K (2016) Mortality and causes of death in patients with Osteogenesis Imperfecta.

- fecta: A register-based nationwide cohort study. *J Bone Miner Res* 31:2159–2166.
- Fratzl-Zelman N, Barnes AM, Weis MA, Carter E, Hefferan TE, Perino G, Chang W, Smith PA, Roschger P, Klaushofer K *et al.* (2016) Non-lethal type VIII Osteogenesis Imperfecta has elevated bone matrix mineralization. *J Clin Endocrinol Metab* 101:3516–3525.
- Guan S, Bai X, Wang Y, Liu Z, Ren X, Zhang T, Ju M, Li K and Li G (2017) Genetic mutation and clinical features of osteogenesis imperfecta type V. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 34:797–801.
- Hanagata N (2016) *IFITM5* mutations and osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab* 34:123–131.
- Ho Duy B, Zhytnik L, Maasalu K, Kändla I, Prans E, Reimann E, Märtson A and Köks S (2016) Mutation analysis of the *COL1A1* and *COL1A2* genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta. *Hum Genomics* 10:27.
- Kang H, Aryal ACS and Marini JC (2017) Osteogenesis imperfecta: New genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl Res* 181:27–48.
- Körkkö J, Ala-Kokko L, De Paepe A, Nuytinck L, Earley J and Prockop DJ (1998) Analysis of the *COL1A1* and *COL1A2* genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only *COL1A1* mutations in 15 patients with Osteogenesis Imperfecta Type I: Identification of common sequences of null-allele mutations. *Am J Hum Genet* 62:98–110.
- Li H and Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079.
- Lindahl K, Åström E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren Ö and Kindmark A (2015) Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 23:1042–1050.
- Liu Y, Wang J, Ma D, Lv F, Xu X, Xia W, Jiang Y, Wang O, Xing X, Zhou P *et al.* (2016) Osteogenesis imperfecta type V: Genetic and clinical findings in eleven Chinese patients. *Clin Chim Acta* 462:201–209.
- Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, Fassier F, Fratzi-Zelman N, Kozloff KM, Krakow D *et al.* (2017) Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers* 3:17052.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M *et al.* (2010) The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salt-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Minillo RM, Sobreira N, Soares MF, Jurgens J, Ling H, Hetrick KN, Doheny KF, Valle D, Brunoni D and Perez AB (2014) Novel deletion of *SERPINF1* causes autosomal recessive osteogenesis imperfecta type VI in two Brazilian families. *Mol Syndromol* 5:268–275.
- Moraes MV, Milanez M, Almada BV, Sipolatti V, Rebouças MR, Nunes VR, Akel Jr AN, Zatz M, Errera FI, Louro ID *et al.* (2012) Variable expressivity of osteogenesis imperfecta in a Brazilian family due to P.G1079S mutation in the *COL1A1* gene. *Genet Mol Res* 11:3246–3255.
- Pepin MG, Schwarze U, Singh V, Romana M, Jones-LeCointe A and Byers PH (2013) Allelic background of *LEPRE1* mutations that cause recessive forms of osteogenesis imperfecta in different populations. *Mol Genet Genomic Med* 1:194–205.
- Rauch F, Fahiminiya S, Majewski J, Carrot-Zhang J, Boudko S, Glorieux F, Mort FS, Bächinger HP and Moffatt P (2015) Cole-Carpenter Syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in *P4HB*. *Am J Hum Genet* 96:425–431.
- Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, Iden S, Wirth B, Eysel P, Koerber F *et al.* (2012). A mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet* 91:349–357.
- Sillence DO, Senn A and Danks DM (1979) Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet* 16:101–116.
- Sule G, Campeau PM, Zhang VW, Nagamani SCS, Dawson BC, Grover M, Bacino CA, Sutton VR, Brunetti-Pierri N, Lu JT *et al.* (2013) Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporos Int* 24:2253–2259.
- van Dijk FS, Pals G, van Rijn RR, Nikkels PGJ and Cobben JM (2010) Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *Eur J Med Genet* 53:1–5.
- van Dijk FS, Byers PH, Dalgleish R, Malfait F, Maugeri AM, Rohrbach M, Symoens S, Siermans EA and Pals G (2012) EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 20:11–19.
- Zhang ZL, Zhang H, Ke YH, Yue H, Xiao WJ, Yu JB, Gu JM, Hu WW, Wang C, He JW and Fu WZ (2012) The identification of novel mutations in *COL1A1*, *COL1A2*, and *LEPRE1* genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab* 30:69–77.

Associate Editor: Maria Luiza Petzl-Erler

Supplementary material

The following online material is available for this article

- Table S1 - Primers used for *COL1A2* gene.
- Table S2 - Primers used for *SERPINH1* gene.
- Table S3 - Primers used for *SERPINF1* gene.
- Table S4 - Primers used for *FKBP10* gene.
- Table S5 - Primers used for *WNT1* gene.
- Table S6 - Primers used for *IFITM5* gene.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

5.2 ARTIGO 2

Artigo referente ao tópico sobre o estudo de antioxidantes no tratamento complementar da OI. Este artigo está em fase de elaboração para posterior submissão. Este artigo devera ser submetido para uma revista de impacto na área de biotecnologia, segundo orientações da PPGBIOTEC.

TÍTULO

Investigação de antioxidantes quanto a viabilidade celular em cultura de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo de pacientes com Osteogenese Imperfeita

RESUMO

A busca por compostos que auxiliam em tratamentos de doenças é um campo de grande interesse da ciência e visa melhorar na qualidade de vida de pacientes portadores de várias enfermidades. Os antioxidantes, compostos que frequentemente agem em mecanismos moleculares envolvidos na proliferação celular, diferenciação óssea e, possivelmente, na remodelagem óssea, são componentes em potencial para estudo no tratamento de doenças. Contudo, é importante validar, por meio de experimentos *in vitro*, seus efeitos em cultura celular. Nesta pesquisa foram investigados os antioxidantes Resveratrol, Ácido ascórbico e Curcumina quanto aos seus efeitos na viabilidade celular de amostras em cultura obtidas de pacientes com esse Imperfeita. Foi observado aumento da proliferação celular em células tratadas com resveratrol e com ácido ascórbico e comprometimento da viabilidade celular de amostras tratadas com curcumina. Estes resultados sugerem que os compostos Resveratrol e Ácido ascórbico são potenciais alvos no tratamento de doenças e poderiam ser investigados quanto a sua potencialidade na melhora da mineralização óssea de doenças do tecido ósseo.

PALAVRAS CHAVE: Resveratrol, Ácido ascórbico, Curcumina, MTT, proliferação celular

INTRODUÇÃO

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos, que podem ser produzidos por plantas e por alguns animais capazes de eliminar espécies reativas e seus derivados. Eles podem inibir ou retardar oxidação, sendo esta uma reação química que pode gerar radicais livres que agem como danificadores celulares (KASOTE, 2015; SALEHI, 2018; HES, 2019).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação: primários, secundários e desativadores de metais. Quanto a sua origem podem ser diferenciados em endógenos naturais enzimáticos e naturais não enzimáticos, sendo que os enzimáticos podem ser categorizados em sistema de defesa primário e secundário; e os antioxidantes naturais de origem alimentar (exogenos) (HES, 2019; PISOSCHI, 2016). Antioxidantes naturais são fundamentais para o bom funcionamento da defesa celular por este motivo viu-se a importância do estudo de alguns desses compostos atrelados ao desenvolvimento ósseo. Três deles são o Resveratrol, Ácido ascórbico e a Curcumina.

O Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno; RES) é um fitoestrogênio polifenólico não flavonoide que pode ser encontrado na natureza na composição de plantas como uvas vermelhas, amendoim, açaí, pinheiros, mirtilos, framboesas, amoras, nozes, pistache, cacau, algumas ervas medicinais asiáticas e também no vinho tinto (BITTERMAR, 2015; CHE, 2016; LEE, 2016; KO, 2017; ASIS, 2019; MURGIA, 2019; RAUT, 2019, ZHOU, 2019). Dentre os efeitos benéficos deste polifenol estão à melhoria na atividade mitocondrial, proteção contra a obesidade e doenças relacionadas à obesidade, supressão de inflamação e crescimento de células cancerígenas, distúrbios cognitivos, proteção contra disfunção cardiovascular e remodelação óssea (BITTERMAR, 2015; CHE, 2016; LEE, 2016; KO, 2017; ASIS, 2019; MURGIA, 2019; RAUT, 2019, ZHOU, 2019). Quanto ao metabolismo ósseo, estudos demonstraram que o resveratrol age no processo de remodelação óssea ao passo que pode auxiliar na formação e atividade de osteoblastos ao mesmo tempo em que inibe a diferenciação e a ação dos osteoclastos (CHE, 2016; LEE, 2016; BORSANI, 2018; RAUT, 2019).

O Ácido L-Ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, é uma vitamina solúvel em água que pode ser encontrada em frutas frescas e vegetais. Ele é um micronutriente que participa da regulação do desenvolvimento, função e manutenção de vários tipos celulares do corpo, atuando na regulação da biossíntese do tecido conjuntivo ou agindo como um agente antioxidante, já que apresenta um alto poder redutor (AGHAJANIAN, 2015; HART, 2015; YONG, 2018). A vitamina C é um componente fundamental na síntese de colágeno, seu papel se deve a sua ação como cofator, influenciando na função da proteína do domínio da proli hidroxilase (PHD), esta enzima hidroxila prolinas que são fundamentais na formação e conformação da cadeia de colágeno (AGHAJANIAN, 2015; DePhillipo, 2018). Por este motivo viu-se que o AA é um modulador crítico na produção de colágeno o que vai além de seu efeito antioxidante (AGHAJANIAN, 2015). O AA apresenta ação sobre vários tipos celulares ósseos. Ele atua positivamente na formação de ossos trabeculares, pela sua influência na expressão de genes da matriz óssea em osteoblastos (AGHAJANIAN, 2015). Níveis abaixo do normal de AA podem causar um distúrbio ósseo levando a fraturas espontânea, crescimento ósseo prejudicado e consolidação óssea prejudicada (AGHAJANIAN 2015; LINDSEY, 2019). Além disso, pesquisas apontam para a ação do AA no aumento da síntese de colágeno e na cicatrização do tecido musculoesquelético (DePHILLIPO, 2018). Por este motivo nota-se a importância do conhecimento dos mecanismos e vias reguladas pelo AA.

A Curcumina (CUR) é um composto natural polifenólico presente no rizoma da curcuma (*Curcuma longa*). Ela possui em sua composição três curcuminoides: 77% de Curcumina, 17% de demetoxicurcumina e 3% de bisdemetoxicurcumina. Nos últimos anos, estudos tem demonstrado que a CUR apresentou ações terapêuticas e atividades biológicas como a ação anti-infecciosa, antioxidantes, anti-inflamatória, tropossupressor, anti-artrítico, quimiopreventivo e anticancerígeno. Além disso, a Curcumina está associada à proteção ossea por inibir a osteoclastogênese afetando diretamente no ciclo da remodelação óssea aumentando assim, a densidade mineral e a microarquitetura óssea em estudos utilizando modelos animais e em pacientes com osteoporose (ROHANIZADEH, DENG AND VERRON, 2016; AHMED et al. 2019; LIANG et al., 2020).

Como os antioxidantes Resveratrol, Ácido Ascórbico e Curcumina apresentam indícios de participação em processo que auxiliam na remodelação óssea e seriam

potenciais alvos para tratamento complementar de doenças do tecido ósseo, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito destes compostos na viabilidade celular de amostras de cultura de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo de pacientes com Osteogenese Imperfeita.

METODOLOGIA

O delineamento experimental desta pesquisa envolveu coleta de tecido adiposo e estabelecimento de cultura celular. Diferenciação de uma alíquota das culturas em células dos tecidos ósseo, adiposo e conjuntivo, para confirmar a presença de células-tronco mesenquimais. Utilização de colorações distintas para confirmar que as células diferenciadas apresentavam características tecido-específicas. Em seguida, as culturas iniciais de células-tronco mesenquimais foram tratadas com os antioxidantes Resveratrol Sigma Aldrich®, Ácido Ascórbico Sigma Aldrich® e Curcumina Sigma Aldrich® em diferentes concentrações e avaliadas quanto a viabilidade celular.

Amostras

Foram coletadas amostras de tecido adiposo de dois pacientes com OI e dois indivíduos que não eram portadores de OI no Hospital Infantil Estadual Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES. As amostras de tecido adiposo foram obtidas em cirurgias ortopédicas realizadas por indicação médica. As amostras foram coletadas com materiais adequados e por profissionais qualificados. A execução dos experimentos foi realizada no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM/UFES). Os participantes da pesquisa ou seus representantes legais consentiram na participação deste estudo por meio de assinatura do termo de consentimento de livre e esclarecido. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos sob o protocolo CAAE 2.171.595.

Processamento do tecido adiposo

Para a preparação e o desenvolvimento da cultura de células a partir de um fragmento do tecido adiposo foi utilizado o protocolo de Zuk 2001 et al., e Zuk et al., 2002 (13 e

14). O fragmento de tecido adiposo coletado foi lavado extensivamente com tampão, phosphate-buffered saline (PBS). Após essa etapa o tecido foi fragmentado logo após foram incubadas overnight por 37°C/5% CO₂ em meio contendo 89% DMEM, 10% Soro fetal Bovino (SFB), 1% de antibióticos e antimicóticos. Após realizada a cultura primária a partir do tecido coletado, as células foram expandidas, utilizando as mesmas condições previamente citadas.

Diferenciação osteogênica

As linhagens celulares foram semeadas numa densidade de 500 células/poço em placas 35x10mm e para cada linhagem foram realizadas 3 repetições. As células foram cultivadas utilizando-se o meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,2 mM de ácido ascórbico 10⁻⁸M de dexametasona e 10mM de glicerolfosfato. A cultura foi mantida por 3 semanas, renovando-se o meio a cada 3 dias. Após este período as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com Vermelho de Alizarina.

Diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica foi realizada com o StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit Gibco™, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto foram plaqueadas 5.000 células/poço em triplicada mais um poço de controle da diferenciação em uma placa de 24 wells. Atingida a confluência de 60-80% iniciou-se a diferenciação, sendo o controle da diferenciação mantido com meio de cultivo padrão. O meio foi trocado a cada 3 dias durante 7 a 14 dias. Após este período foram retirados os meios de cultivo e diferenciação e as células lavadas com PBS 1X e fixadas com fomaldeído 10% e coradas com Oil Red.

Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada com o StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit Gibco™, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto foi realizada a diferenciação a partir de cultura de micromasas, onde foi necessário obter 1,6 x 10⁷ de células por mL. Para esta metodologia foram feitas 3 gotas de 5µL contendo 1,6 x 10⁷ de células por mL cada, sendo que esta etapa foi realizada em

triplicata mais um controle negativo para a diferenciação. Ao término do plaqueamento, as células foram levadas à incubadora por volta de 2 horas para que a micromassa fosse fixada. Após este período foi adicionado o meio de diferenciação em cada well que compunha a triplicata, sendo o controle da diferenciação mantido com meio de cultivo padrão. As trocas dos meios foram realizadas a cada 3 dias em torno de 14 dias. Após este período as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com azul de toluidina.

Tratamento das culturas com agentes antioxidantes

Para a selecionar as melhores concentrações de Resveratrol, Ácido Ascórbico e Curcumina em cultura foram testadas três concentrações diferentes de cada um dos antioxidantes.

Para o Resveratrol foram utilizadas as concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$. As culturas foram tratadas com resveratrol por 72hs. Foi realizada a avaliação de viabilidade celular após 24hs, 48hs e 72hs de exposição.

As concentrações de 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram utilizadas para análise do Ácido Ascórbico. As culturas foram tratadas por 72hs. Foi realizado o teste de viabilidade celular após 24hs, 48hs e 72hs de exposição ao Ácido Ascórbico.

Para a Curcumina foram usadas as concentrações de 0,3, 0,5 e 0,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$. As culturas foram tratadas com este composto por 24hs. Em seguida o meio contendo tal componente foi retirado e substituído por meio suplementado sem Curcumina. Logo após esta etapa foi realizada a avaliação de viabilidade celular.

Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico por MTT

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizada a metodologia de MTT, descrita por Mosmann, 1983, baseada na metabolização do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Invitrogen™, pelas mitocôndrias das células viáveis. Foram plaqueadas 2.000 células/well para cada indivíduo estudado em triplicata, em três placas de 96 wells com meio de cultivo. Após tratamento das culturas foi realizada a metodologia de MTT de 24 em 24h da seguinte forma: foi removido o meio de cultivo e o meio contendo os antioxidantes e adicionado 10 μL de MTT mais 90 μL de meio F12 em cada well com células. A placa de cultura envolta em papel alumínio e

incubada a 37°C por 4 horas. Após a incubação o meio contendo MTT foi removido e acrescentado 100µL de DMSO em cada well. Em seguida a placa foi incubada novamente envolta em papel alumínio por uma hora. Após este período a placa foi submetida ao espectrofotômetro em uma absorvância de 570nm. Feita a leitura, os dados foram trabalhados realizando-se as médias e porcentagens das células viáveis para cada concentração dos antioxidantes pela seguinte fórmula (%) = $(A_{\text{tratado}} \times 100) / A_{\text{controle}}$ onde A_{tratado} é a média da absorvância de uma dada concentração em que as células foram expostas e A_{controle} é a média da absorvância das células mantidas somente com meio suplementado sem antioxidante.

RESULTADOS

Cultura de Células-Tronco Mesenquimal

As culturas obtidas de tecido adiposo a partir de biopsia de pacientes apresentaram células com morfologia de células-tronco mesenquimais indiferenciadas (figura 1A). Alíquotas das culturas foram submetidas a diferenciações celulares.

As células obtidas após cultivo em meio osteogênico por 21 dias, apresentavam depósitos de cálcio, evidenciado pelo corante vermelho de alizarina que possui afinidade ao cálcio (figura 1B), sugerindo sucesso na diferenciação osteogênica.

As células observadas após cultivo em meio adipogênico por 14 dias, apresentavam citoplasma com formação de gotículas lipídicas, evidenciado pelo corante Oil Red O (figura 1C), sugerindo diferenciação adipogênica.

As células semeadas após cultivo em meio condrogênico por 14 dias, segregavam matriz de proteoglicanas, evidenciados pelo corante azul de toluidina (figura 1D), sugerindo diferenciação condrogênica.

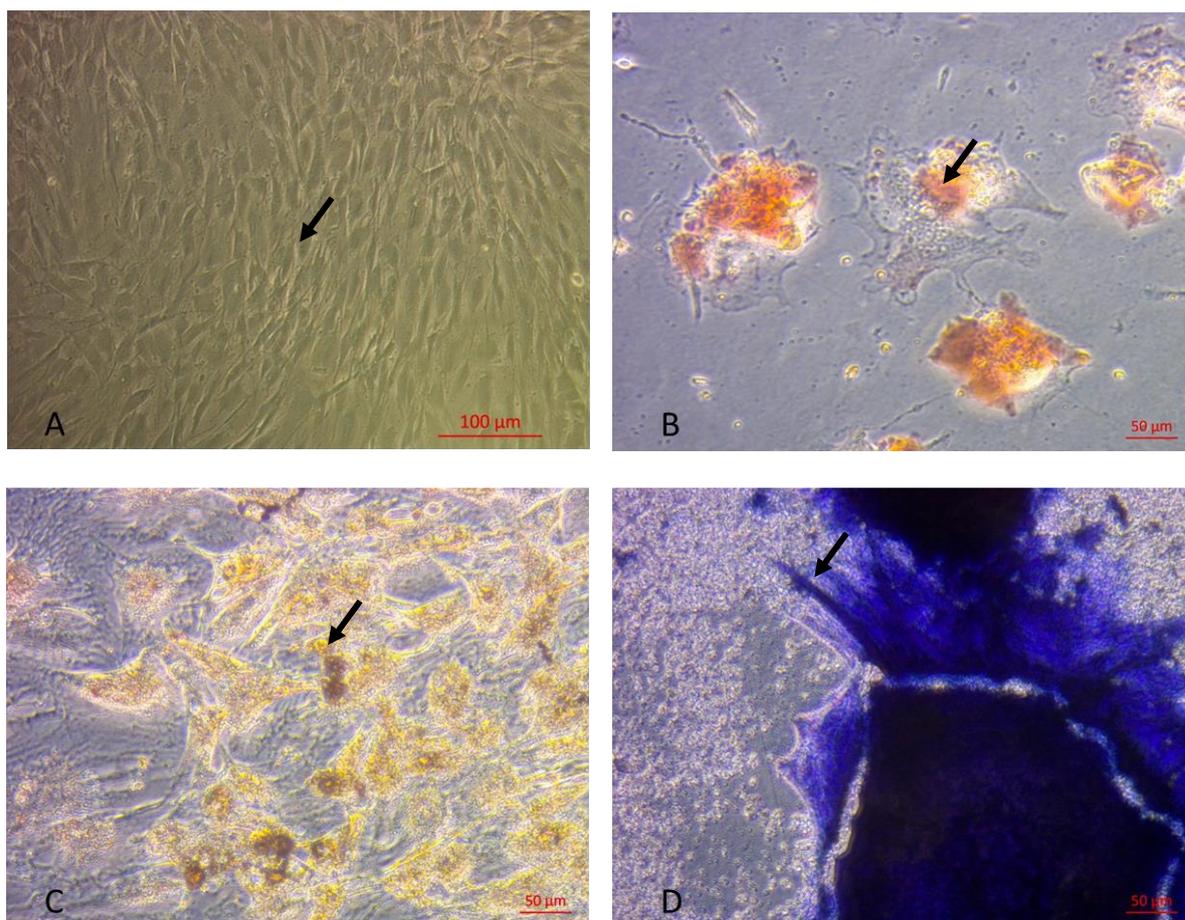


Figura 1: Validação de célula-tronco mesenquimal em cultura celular. A) Células com morfologia fusiforme, sugerindo células-tronco mesenquimais. B) Coloração positiva com vermelho de alizarina S., sugerindo diferenciação osteogênica. C) Coloração positiva para Oil Red O, mostraram gotas de lipídio a nível citoplasmático, sugerindo diferenciação adipogênica. D) Coloração positiva com azul de Toluidina, evidenciando síntese de proteoglicanos no meio extra-celular, sugerindo diferenciação condrogênica.

Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular as células foram expostas a três concentrações de Resveratrol, Ácido ascórbico e Curcumina.

As células quando expostas ao Resveratrol apresentaram viabilidade acima de 100% para alguns dos experimentos (Figura 2). O melhor tratamento obtido quanto a viabilidade celular para o resveratrol foi o de 25 μM/mL por 48h. O tratamento realizado de 12,5 μM/mL de resveratrol por 48hs também apresentou resultados de grande potencial. Em geral, os tratamentos realizados por 24hs e 72hs não apresentaram resultados tão promissores quanto aqueles realizados por 48hs.

O Ácido ascórbico manteve a viabilidade celular com pouca variação em relação da concentração e tempo de exposição (Figura 3). O melhor tratamento obtido com este composto foi o utilizou a concentração de 10 µg/mL por 48hs.

Todos os tratamentos realizados com a curcumina apresentaram viabilidade celular abaixo de 100% (Figura 4). Os tratamentos que causaram menor dano às células foram aqueles em que as amostras foram submetidas a um menor tempo de exposição a deste composto. O melhor resultado obtido (aproximadamente 85% de viabilidade celular) no tratamento da curcumina foi o de 3 µg/mL por 24hs.

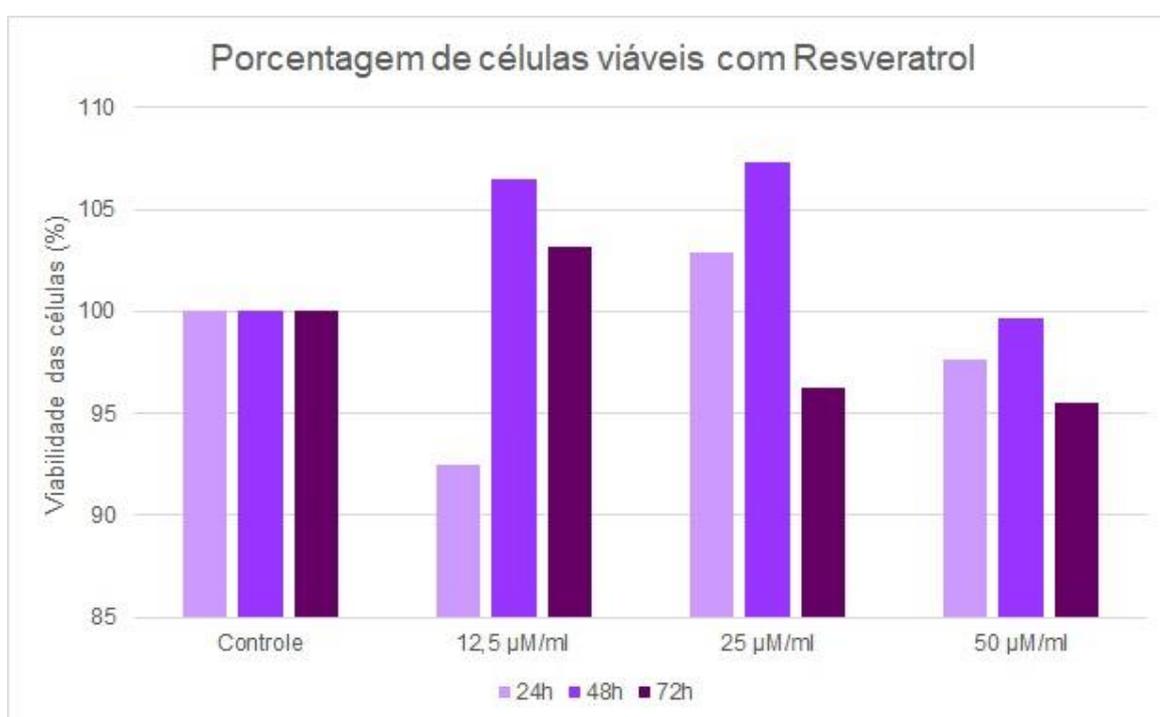


Figura 2: Porcentagem de células viáveis expostas a três concentrações de resveratrol com intervalo de 24h.

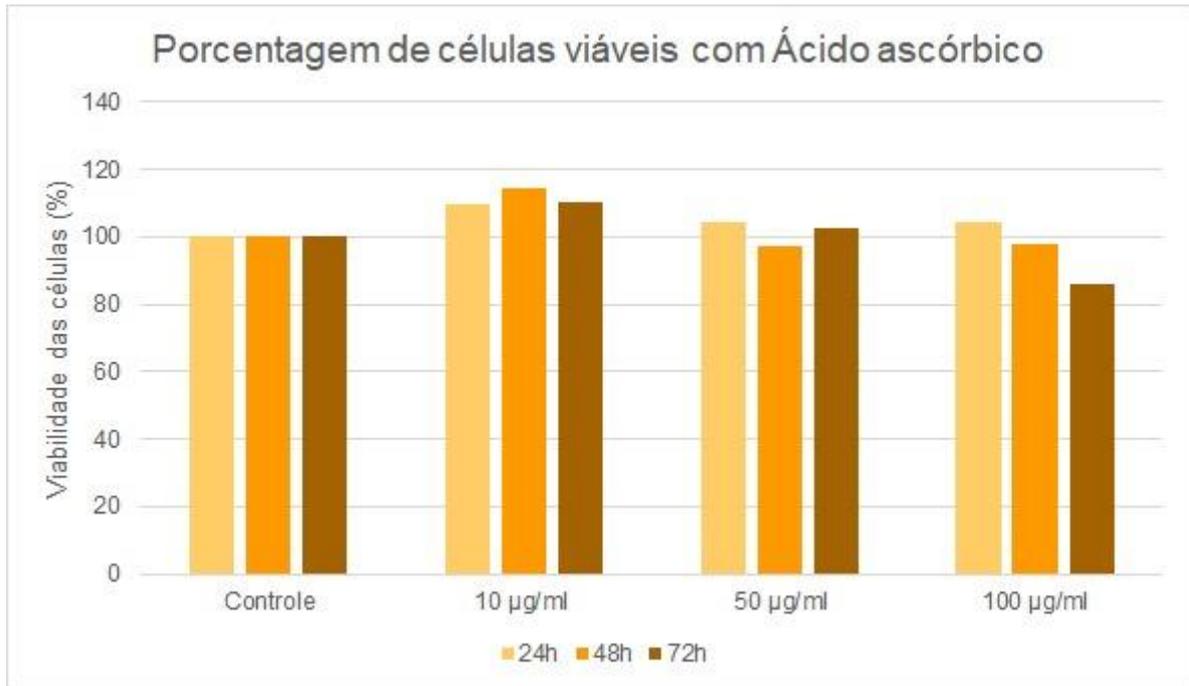


Figura 3: Porcentagem de células viáveis expostas a três concentrações de Ácido ascórbico com intervalo de 24h.

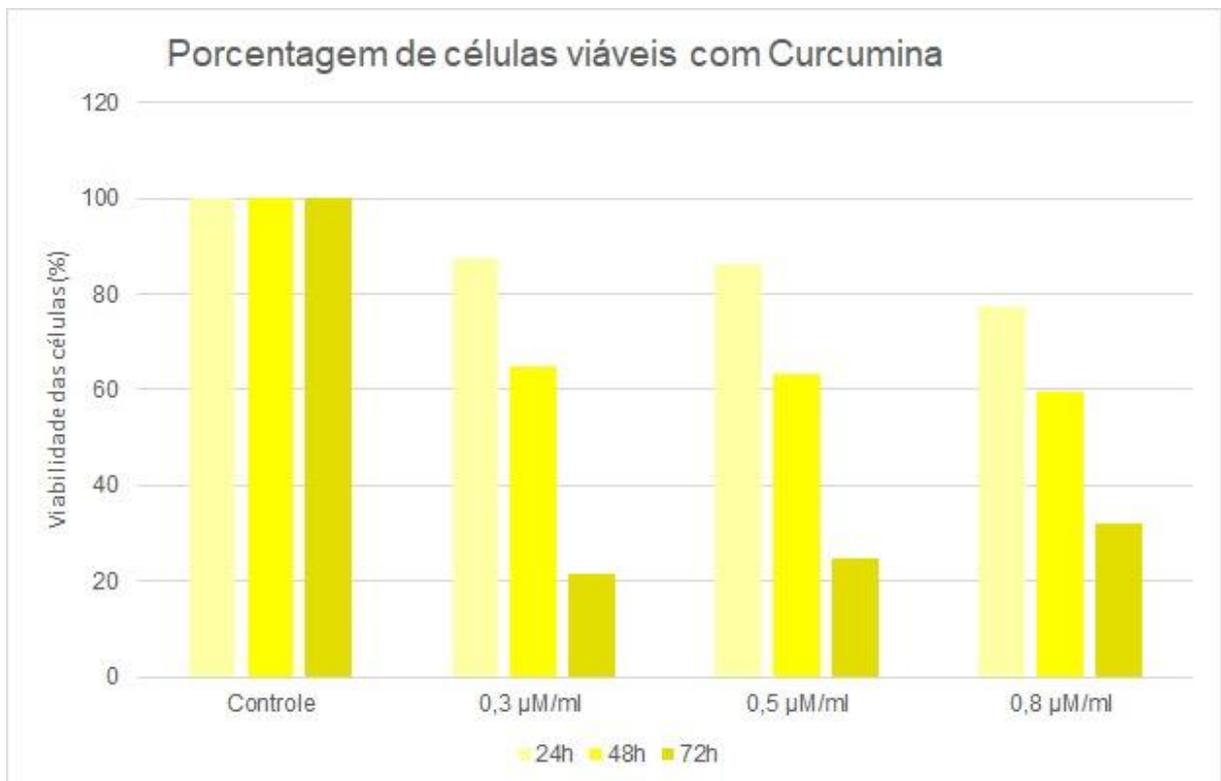


Figura 4: Porcentagem de células viáveis expostas a três concentrações de Curcumina com intervalo de 24h.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Esta pesquisa avaliou o impacto dos antioxidantes resveratrol, ácido ascórbico e curcumina na viabilidade celular de amostras *in vitro* obtidas de cirurgias ortopédicas. Os resultados sugerem que células tratadas com resveratrol e ácido ascórbico apresentam boa viabilidade celular, sendo compostos em potencial para o desenvolvimento de alvos terapêuticos de doenças.

Substâncias com caráter antioxidante têm sido alvos de pesquisas por demonstrarem efeitos como agentes anti-inflamatório, anticancerígeno e antienvhecimento. Além disso, muitas delas também promovem papel importante no que diz respeito ao desenvolvimento e manutenção do metabolismo ósseo.

A viabilidade celular também foi investigada por Zhou et al. (2019) que constatou que houve melhor nível de viabilidade celular em culturas tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de resveratrol. Zhou et al. (2019) verificaram que o resveratrol em concentrações acima de 15 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (20 e 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$) provocava decaimento na viabilidade celular. Em nossos estudos foi demonstrado que a viabilidade celular aumentava quando as células eram expostas a concentração de 12,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$, resultado que delimitou a melhor concentração de resveratrol em experimentos *in vitro*.

Não houve muita variação quanto a viabilidade celular das amostras tratadas com ácido ascórbico em relação ao controle na nossa pesquisa. Em quase todos os tratamentos com ácido ascórbico a viabilidade ficou próxima a 100% de células viáveis. Os melhores resultados foram aqueles obtidos das culturas tratadas com concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, e em particular aquelas expostas por 48hs. Neste caso, foi obtido, aproximadamente, 110% de células viáveis.

O tratamento de culturas celulares com curcumina foi previamente descrito por Moran et al. (2012). Utilizando concentrações de 10, 20, 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de curcumina estes pesquisadores observaram decaimento de células viáveis nas primeiras 24h de exposição (Moran et al., 2012). O melhor resultado obtido de Moran et al. (2012) foi para as culturas tratadas com 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de curcumina. Na nossa pesquisa utilizamos concentrações menores de curcumina (0,3 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 0,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$), contudo, também observamos que as células tratadas apresentaram um decaimento na

viabilidade celular à medida que o tempo de exposição ao composto aumentava, sugerindo que este composto pode ser tóxico em cultura celular, mesmo em pequenas concentrações.

Notoya et al. (2006) avaliando tratamento de curcumina em cultura celular observou que quando células primárias semelhantes a osteoblastos (ROB) foram expostas a $1 \times 10^{-5}M$ de curcumina por 24 e 48h elas apresentaram inibição da proliferação celular.

CHEN e HUANG (1998), BUSH et al. (2001) e ANTO et al. (2002) observaram que outros tipos celulares também são afetados pela exposição a curcumina, como células musculares lisas vasculares, células de melanoma humano e células HL-60. Estes pesquisadores sugeriram que a curcumina causa apoptose em cultura celular. Notoya et al. (2006) sugere que a curcumina interrompe o ciclo celular por meio de regulação positiva da expressão do inibidor de cdk (p21WAF1/CIP1), que atua na regulação da progressão do ciclo celular. Chan et al. (2006) mostraram que osteoblastos expostos a curcumina nas concentrações de 12,5 - 25 μM apresentavam níveis baixos de ATP causando apoptose celular. Níveis altos de ATP são essenciais para a manutenção da morfologia nuclear celular. Estes pesquisadores também observaram que os níveis de ATP intracelular eram diminuídos pela exposição de curcumina de forma dose-dependente, podendo levar ao estágio de necrose a concentração de 50 μM de curcumina (CHAN et al., 2006).

Nossos resultados sugerem que células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo expostas aos antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico na concentração de 12 $\mu M/mL$ tratado por 48hs e 10 $\mu M/mL$ tratado por 48hs, respectivamente, melhoram a viabilidade celular de amostras em cultura. O antioxidante curcumina provoca baixa viabilidade celular em amostras de cultura, sendo provavelmente tóxico para células em cultura. Estes resultados poderam ajudar a indicar antioxidantes promissores no tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTO, R.J. et al. 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. v.23. p.143–150. 2002.

ASIS M. et al. Effects of resveratrol supplementation on bone biomarkers: a systematic review and meta-analysis. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*. v. 1457 (2019). p. 92–103. 2019.

BITTERMAN J. L., CHUNG J. H. Metabolic Effects of Resveratrol-addressing the controversies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 72(8): p. 1473–1488. 2015.

BUSH JR., J.A., CHEUNG, K.J., LI, G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp. Cell Res*. v.271, p.305–314. 2001.

CHE C. T. et al. Natural Products from Chinese Medicines with Potential Benefits to Bone Health. *Molecules*. v. 21. p. 1-52. 2016.

CHEN, H.W., HUANG, H.C., 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol*. v.124, p.1029–1040. 1998.

CHEN, H.W., HUANG, H.C., 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol*. v.124, p.1029–1040. 1998.

DePHILLIPO N. N. et al. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries. *The Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. v. 6(10). p. 1-9. 2018.

HES M. et. al. Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. v. 74. p. 255–265. 2019.

KASOTE D.M. et al. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. v. 11(8). p. 982-991. 2015.

- KO J. H. et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 18. p. 1-36. 2017.
- LEE A. M. C. et al. Effects of Resveratrol Supplementation on Bone Growth in Young Rats and Microarchitecture and Remodeling in Ageing Rats. *Nutrients*. v. 6. p. 5871-5887. 2014.
- LIANG Y. et al. Curcumin protects bone biomechanical properties and microarchitecture in type 2 diabetic rats with osteoporosis via the TGF β /Smad2/3 pathway. *Experimental And Therapeutic Medicine*. v. 20. p. 2200-2208. 2020.
- LINDSEY R.C., CHENG S., MOHAN S. Vitamin C effects on 5-hydroxymethylcytosine and gene expression in osteoblasts and chondrocytes: Potential involvement of PHD2. *PLoS ONE*. v.14. p. 1 -23. 2019.
- MORAN J.M. et al. Effects of Curcumin on the Proliferation and Mineralization of Human Osteoblast-Like Cells: Implications of Nitric Oxide. *International Journal of Molecular Sciences*. v.13, p.16104-16118. 2012.
- MOSMANN T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Meth.* v. 65. p. 55–63, 1983.
- MURGIA D. et al. Advance on Resveratrol Application in Bone Regeneration: Progress and Perspectives for Use in Oral and Maxillofacial Surgery. v. 9. p. 1-16. 2019.
- NOTOYA M. et al. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *European Journal of Pharmacology*. v.534. p.55–62. 2006.
- PISOSCHI A. M. et. al. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2016. p. 1-36. 2016.
- RAUTA N. et al. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacological Research*. v. 147. p. 1-14. 2019.
- ROHANIZADEH R., YI DENG Y., VERRON E. Therapeutic actions of curcumin in boné Disorders. *BoneKEy Reports*. v. 5. p. 1-7. 2016.
- SALEHI B. et. al. Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*. v. 8. p. 1-11. 2018.

ZHOU T. et al. Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production via AMPK activation. v. 24,. n. 1. p. 62–69. 2019.

ZUK, P.A.; Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*. v. 13, p.4279–4295, 2002.14. ZUK, P.A.; Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *TISSUE ENGINEERING*. v. 7, N. 2, p. 211-228, 2001.

6 CONCLUSÕES

A Osteogenese Imperfeita é uma doença que apresenta grande variabilidade clínica e genética. Mais de 20 genes distintos, com padrões de herança diferentes, relacionados com OI já foram descritos. O trabalho desta tese identificou cinco genes (*COL1A1*, *COL1A2*, *FKBP10*, *P3H1* e *IFITM5*) que apresentam maior taxa de mutações em pacientes com OI do estado do Espírito Santo/Brasil. Este resultado pode ajudar no planejamento de estratégias de diagnóstico molecular. A identificação de mutações nos pacientes torna o aconselhamento genético mais preciso e contribui com a prevenção de novos casos da doença.

Assim como o diagnóstico, existe um esforço constante na busca de novos tratamentos para doenças, como aquelas do tecido ósseo. Os antioxidantes, como o Resveratrol, Ácido ascórbico e curcumina, são compostos promissores e vários estudos sugerem que estão relacionados com a remodelação óssea. Assim, são necessários estudos *in vitro* para avaliar a segurança destes compostos. Os resultados desta tese sugerem que o resveratrol e o ácido ascórbico promovem a proliferação celular em cultura de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, enquanto a curcumina prejudica a viabilidade das células em amostras *in vitro*. Estes resultados podem indicar compostos promissores que auxiliam na proliferação celular atuando como substâncias alvo em potencial para estudo de tratamento complementar de doenças ósseas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

As células-tronco tratadas que apresentaram boa viabilidade celular com os antioxidantes resveratrol e ácido ascórbico serão diferenciadas em células osteogênicas e será avaliado o grau de mineralização e o padrão de expressão dos genes relacionados a remodelação óssea. Estes estudos serão realizados em um maior número de amostras controles e amostras de pacientes com OI. Além disso, serão realizados experimentos para avaliar a exposição combinada das melhores concentrações dos três antioxidantes nas células estudadas nessa pesquisa. Acreditamos que estes experimentos futuros contribuirão com a elaboração de um artigo mais robusto para publicação e melhorarão as evidências relacionadas com a

contribuição destes compostos como substâncias potencialmente alvo no tratamento de doenças do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

AGHAJANIAN P. et al. The Roles and Mechanisms of Actions of Vitamin C in Bone: New Developments. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 30. n. 11. p. 1945–1955. 2015.

ALLGROVE J., SHAW N.J. Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents. *Endocrine Development*. v. 16. p. 32–48. 2009.

ALMEIDA, P. N.; et al. Proposing the use of dental pulp stem cells as a suitable biological model of neurofibromatosis type 1. *Child's Nervous System*. v. 31(1). p. 7-13. 2014.

ANTO, R.J. et al. 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. v.23. p.143–150. 2002.

ASIS M. et al. Effects of resveratrol supplementation on bone biomarkers: a systematic review and meta-analysis. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*. v. 1457 (2019). p. 92–103. 2019.

BALJET B. Aspects of the history of Osteogênese Imperfeita (Vrolik's syndrome) *Ann Anat*. v. 184. p. 1-7. 2002.

BALJET B. Willem Vrolik als teratoloog. *Ned Tijdschr Geneesk*. v.128, p. 1530-1534. 1984.

BARBALHO M. S. et al. The Potential Role of Medicinal Plants in Bone Regeneration. *Medicinal Plants in Bone Regeneration*. v. 25. n. 4. p. 32-39.

BINGREN T., JIAYUE L. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 100. p. 1392-1404. 2020.

BITTERMAN J. L., CHUNG J. H. Metabolic Effects of Resveratrol-addressing the controversies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 72(8): p. 1473–1488. 2015.

BUSH JR., J.A., CHEUNG, K.J., LI, G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp. Cell Res.* v.271, p.305–314. 2001.

CHE C. T. et al. Natural Products from Chinese Medicines with Potential Benefits to Bone Health. *Molecules.* v. 21. p. 1-52. 2016.

CHEN, H.W., HUANG, H.C., 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* v.124, p.1029–1040. 1998.

CHETTY M., ROOMANEY I., BEIGHTON P. The Evolution of the Nosology of Osteogenesis Imperfecta. *Clinical Genetic.* v. 99. p. 42-52. 2021.

CHIN K. Y. AND IMA-NIRWANA S. Vitamin C and Bone Health: Evidence From Cell, Animal and Human Studies. *Current DrugTargets.* v. 19. p. 439-450. 2018.

DATTA H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology.* v. 61. p. 577–587. 2018.

DePHILLIPO N. N. et al. Efficacy of Vitamin C Supplementation on Collagen Synthesis and Oxidative Stress After Musculoskeletal Injuries. *The Orthopaedic Journal of Sports Medicine.* v. 6(10). p. 1-9. 2018.

EL-GAZZAR A., HÖGLER W. Mechanisms of Bone Fragility: From Osteogenesis Imperfecta to Secondary Osteoporosis. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 22. p. 1-18 . 2021.

FENG X. AND MCDONALD J. M. Disorders of Bone Remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* v. 6. p. 121-145. 2011.

GRAY P.H.K. A case of Osteogênese Imperfeita, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity. *Clin. Radiol.* v. 20, p. 106-108. 1969.

HART A. et al. The Role of Vitamin C in Orthopedic Trauma and Bone Health. *The American Journal of Orthopedics.* v. 44(7). p. 306-311. 2015.

HES M. et. al. Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. v. 74. p. 255–265. 2019.

HYEWON KONG H., CHANDEL N. S. Regulation of redox balance in cancer and T cells. *Jornal Biological Chemistry*. v. 293(20). p. 7499 –7507. 2017.

KASOTE D.M. et al. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. v. 11(8). p. 982-991. 2015.

KO J. H. et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 18. p. 1-36. 2017.

LEE A. M. C. et al. Effects of Resveratrol Supplementation on Bone Growth in Young Rats and Microarchitecture and Remodeling in Ageing Rats. *Nutrients*. v. 6. p. 5871-5887. 2014.

LIANG Y. et al. Curcumin protects bone biomechanical properties and microarchitecture in type 2 diabetic rats with osteoporosis via the TGF β /Smad2/3 pathway. *Experimental And Therapeutic Medicine*. v. 20. p. 2200-2208. 2020.

LINDSEY R.C., CHENG S., MOHAN S. Vitamin C effects on 5-hydroxymethylcytosine and gene expression in osteoblasts and chondrocytes: Potential involvement of PHD2. *PLoS ONE*. v.14. p. 1 -23. 2019.

LOWENSTEIN E.J. Osteogênese Imperfeita in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv Syst*. v. 25, p. 515–516. 2009.

MILLER, S.A.; DYKES D.D.; POLESKY H.F. A Yesple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.16, n.3, p.1215, 1988.

MORAN J.M. et al. Effects of Curcumin on the Proliferation and Mineralization of Human Osteoblast-Like Cells: Implications of Nitric Oxide. *International Journal of Molecular Sciences*. v.13, p.16104-16118. 2012.

MURGIA D. et al. Advance on Resveratrol Application in Bone Regeneration: Progress and Perspectives for Use in Oral and Maxillofacial Surgery. v. 9. p. 1-16. 2019.

MOSMANN T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Meth*. v. 65. p. 55–63, 1983.

NOTOYA M. et al. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *European Journal of Pharmacology*. v.534. p.55–62. 2006.

OOSTRA RJ, Baljet B, Dijkstra PF, Hennekam RCM. Congenital anomalies in the teratological collection of Museum Vrolijk in Amsterdam, The Netherlands. II: Skeletal dysplasias. *Am J Med Genet*. v. 77, p.116-134. 1998.

PALOMOA T., VILAC T., LAZARETTI-CASTROA M. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. v. 24. p. 381-388. 2017.

PÉREZ-SAYÁNS M. et al. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 109. p. 679-686. 2010.

PISOSCHI A. M. et. al. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2016. p. 1-36. 2016.

RAUTA N. et al. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacological Research*. v. 147. p. 1-14. 2019.

RIANCHO J. A. Y DELGADO-CALLE J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatología Clínica*. v. 7. p. 1-4. 2011.

ROHANIZADEH R., YI DENG Y., VERRON E. Therapeutic actions of curcumin in bone Disorders. *BoneKEy Reports*. v. 5. p. 1-7. 2016.

ROSSI V., et al. Osteogenesis imperfecta. Advancements in genetics and treatment. *Curr Opin Pediatr*. v.31(6). p.708–715. 2020.

SALEHI B. et. al. Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*. v. 8. p. 1-11. 2018.

SCHMIDT H.H.W.H. et al. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxidants In Translational Medicine*. v. 23. n. 14. p. 1130-1143. 2015.

SILLENCE D. O., et al. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfect. *Journal of Medical Genetics*. v. 16, p. 101-116. 1979.

TOURNIS S. AND DEDE A.D. Osteogenesis Imperfecta-a clinical update. *Metabolism*. v. 80. p. 27-37. 2017.

WAGNER E. F., KARSENTY G. Genetic control of skeletal development. *Current Opinion in Genetics & Development*. v. 11. p.527–532. 2001.

ZHOU T. et al. Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production via AMPK activation. v. 24,. n. 1. p. 62–69. 2019.

ZUK, P.A.; Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*. v. 13, p.4279–4295, 2002.14. ZUK, P.A.; Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *TISSUE ENGINEERING*. v. 7, N. 2, p. 211-228, 2001.