

LIANE DE ROSSO GIULIANI

**EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE ACVR1 (R206H) POR  
siRNA, SOBRE A EXPRESSÃO DE ACVR1 E BMP4 EM  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES PORTADORES DE FIBRODISPLASIA  
OSSIFICANTE PROGRESSIVA.**

CAMPO GRANDE – MS

2015

LIANE DE ROSSO GIULIANI

**EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE ACVR1 (R206H) POR  
siRNA, SOBRE A EXPRESSÃO DE ACVR1 E BMP4 EM  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES PORTADORES DE FIBRODISPLASIA  
OSSIFICANTE PROGRESSIVA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde e Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa  
Martins

CAMPO GRANDE – MS

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

LIANE DE ROSSO GIULIANI

**EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE ACVR1 (R206H) POR  
siRNA, SOBRE A EXPRESSÃO DE ACVR1 E BMP4 EM  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
PACIENTES PORTADORES DE FIBRODISPLASIA  
OSSIFICANTE PROGRESSIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde e Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Resultado: \_\_\_\_\_

Campo Grande / MS, 28 de Maio de 2015.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Almir de Sousa Martins – Universidade Federal de Minas Gerais

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fabiana Alves - FASEH - Faculdade da Saúde e Ecologia Humana

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Anna Maria Miglioli - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

\_\_\_\_\_  
Profª. Dr. Durval Palhares - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Carmen Silvia Martimbianco de Figueiredo - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

\_\_\_\_\_  
Profª. (Suplente)- Profª. Dra. Paula Xavier - UFMS

\_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos os  
pacientes com FOP e seus  
familiares

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Dr. Almir de Sousa Martins, pela paciência, confiança e orientação, que muitas vezes extrapolaram as fronteiras da orientação técnica. A sua serenidade “mineira” singular que me ensinou muitas vezes a lidar com situações adversas. Por compartilhar comigo seu conhecimento, tempo e experiência. Considero este trabalho o início de uma grande parceria que resultará em muitos outros trabalhos para a nossa Universidade.
- Ao Prof. Dr. Durval Batista Palhares, pelo grande apoio e incentivo! Pelo exemplo de Pessoa e Professor que és! Pela oportunidade que criaste em 2005-2006 a qual permitiu que eu concorresse a vaga de docente da UFMS. Pela persistência em me convencer a trabalhar com FOP e a dedicar mais atenção ao tratamento das doenças raras: amadureci pessoal e profissionalmente com isto! Eternamente grata!
- A Deborah Nascimento, pelo apoio e colaboração. Sem ela eu não teria conseguido realizar este trabalho!!! Você foi fundamental... Muito grata!
- Ao Reynaldo, Paula Xavier, Paula Serafim, Floriano, Massaco, Jhony e Fátima pelo auxílio nas coletas. O empenho e disposição de vocês me comoveu muitas vezes. Vocês são especiais!
- A equipe do laboratório de fisiologia e biofísica do NUFIGEN/Instituto de biociências /UFMG, pela colaboração. Especialmente: a Profa. Dra. Elaine Maria Souza Fagundes e seus alunos pela montagem do protocolo; a Profa. Dra. Fabiana Alves pela colaboração no projeto; ao Doutorando Francisco de Oliveira Vieira, pela preparação histológica.
- Às secretárias da pós-graduação Vera e Áurea, pela atenção e dedicação em ajudar sempre.
- Ao IAPES – Instituto de Assistência, Pesquisa e Ensino em Saúde, pelo auxílio nas viagens para realização das coletas.
- Aos colegas da Pediatria pela compreensão e apoio.
- A Doroti, Ana Claudia e Danilo pelo apoio quando precisei me ausentar.

- A banca de qualificação pela disposição de estar aqui num dia que foi decretado ponto facultativo na UFMS, auxiliando nos ajustes. Ao Dr. Petr pelas correções e sugestões neste período.

- Aos meus amigos, pelas conversas e conselhos, pelos desabafos e também pelos abraços, que muitas vezes foram imprescindíveis... Especialmente a Tatiana Russi (irmã de coração!) e Danilo Vilela.

- A minha Mãe, pelo apoio, incentivo constante, conselhos práticos e objetivos. Você é meu maior exemplo de superação que ajuda a transcorrer os obstáculos. Te amo!

- As minhas irmãs, pelo apoio e por me incentivarem a ser sempre melhor. Amo vocês!

- Ao Rodrigo um companheiro maravilhoso!!! Pelo amor, carinho e compreensão, pelo apoio e suporte. Por me incentivar sempre e por ser tão especial pra mim. Te amo!

- A minha filha Lis que nestas últimas semanas falou *“quando mamãe vai voltar pra mim?!”* reclamando das horas da noite e final de semana que *“seriam dela”*. Estou *“voltando”* Amor Eterno!!!!

- A Rose Sodré que tem me conduzido, com muita competência, pela elaboração de questões importantes no transcorrer deste período.

- Aos Pacientes e familiares, aos voluntários sadios, sem a colaboração de vocês não haveria esse trabalho. Especialmente a estas duas famílias: Alexandre, Dra Marilene e Dr. Durval: vocês são grandes exemplos para mim! e a Deborah, Rosemeire e Atílio: obrigada pela confiança!

*Nam-Myoho-Renge-Kyo*

## RESUMO

**Giuliani, L. R.** Efeito do silenciamento gênico de ACVR1 (R206H) por siRNA, sobre a expressão de *ACVR1* e *BMP4* em células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de fibrodissplasia ossificante progressiva. Campo Grande, 2015. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

**Introdução:** FOP é uma doença genética autossômica dominante complexa e rara, caracterizada por anomalias congênitas esqueléticas sendo o halux valgo uma característica patognomônica. Evolui com ossificação heterotópica progressiva, formando um exo esqueleto até a adolescência. Os portadores apresentam mutação em heterozigose (c.617G>A, p.R206H) no gene *ACVR1*, no cromossomo 2q23-24. Mutações no *ACVR1* são de ganho de função. A substituição da arginina pela histidina na mutação, cria uma alteração alostérica dentro do domínio do receptor, pH-sensível, ativando a via de sinalização das BMPs independentemente da BMP. Portanto a fisiopatologia da FOP envolve o desequilíbrio da via de sinalização das BMPs e sua interação complexa com múltiplas vias moleculares e do sistema imunológico. Experimentos *in vitro*, de cultivo primário de leucócitos de pacientes não têm sido explorados e deverão ser importantes modelos na avaliação da via gatilho da doença e de sua interação com medicamentos utilizados no controle das crises agudas. **Objetivos:** Determinar um modelo experimental para o silenciamento da expressão gênica do *ACVR1* (R206H) em cultura de PBMC de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário e avaliar o efeito do siRNA sobre a expressão de *ACVR1* e *BMP4*. **Métodos:** Amostras de sangue total foram coletadas para cultivo de células mononucleares (PBMC) de doze voluntários (6 portadores de FOP e 6 controles saudáveis). Células foram tratadas com siRNA para *ACVR1* mutado e siRNA para *ACVR* normal, carregadas por nanopartículas de carbono. O RNA total extraído pelo Stat60, submetido a RT e PCRtr. Teste t não pareado foi utilizado para avaliar a expressão gênica. **Resultados e Conclusão:** O presente trabalho mostra que estudos moleculares de silenciamento gênico utilizando o modelo de PBMC e nanopartículas de carbono, é viável. Como é um modelo relativamente simples permitirá futuros estudos na compreensão da fisiopatologia da FOP. Observamos no presente trabalho que houve o silenciamento do gene alvo *ACVR1*, embora o mecanismo pelo qual o *ACVR1* ficou superexpresso não tenha ficado muito claro. Mas quando observamos a expressão do gene *ACVR1* e analisamos em conjunto com a expressão de *BMP4*, percebemos que ocorreu uma modulação quando as células foram tratadas com RNAi.

Palavras chave: Fibrodissplasia Ossificante Progressiva; RNAi; Expressão gênica.

## ABSTRACT

Giuliani, L. R. Effect of gene silencing of ACVR1 (R104H) by siRNA on the expression of ACVR1 and BMP4 in peripheral blood mononuclear cells of patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. Campo Grande, 2015. [Thesis - Federal University of Mato Grosso do Sul].

**Introduction:** FOP is a complex autosomal dominant genetic rare disease and characterized by congenital skeletal abnormalities being the hallux valgus one pathognomonic feature and heterotopic ossification progressive postnatal. The patients present a heterozygous mutation (c.617G> A, p.R206H) in the ACVR1 gene, on chromosome 2q23-24. Studies of the pathophysiology of FOP involve imbalance in the signaling pathway of BMP and its interaction with multiple molecular pathways and the immune system. ACVR1 mutations are gain of function, activating the signaling pathway of BMP independent of ligand. The substitution of arginine for histidine at mutation creates an allosteric change in the receptor domain, activating the receptor independently of the BMP. Experiments in vitro of primary culture of leukocytes of patients have not been explored and will be important of models in assessing via trigger of the disease interaction with medication used to control acute flare-ups. **Objectives:** Determination of an experimental model for the silencing of gene expression of ACVR1 (R206H) in cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of FOP patients obtained by primary culture and the effect of siRNA on the expression of ACVR1 and BMP4. **Methods:** Whole blood samples were collected for mononuclear cell cultures (PBMC) of ten volunteers (6 people with FOP and 4 healthy controls). Cells were treated with siRNA and siRNA for mutated ACVR1 and normal ACVR1. Cells were treated with siRNA for ACVR1 mutated and with siRNA for normal ACVR1. Total RNA extracted by Stat60 subjected to RT and PCRtr. Unpaired t test was used to assess gene expression. **Results and Conclusion:** This work shows that molecular studies of gene silencing using the model of PBMC and carbon nanoparticles is feasible. Since it is a relatively simple model, it will allow future studies in the understanding of the pathophysiology of the FOP. We observed in the present work that there was the silencing of the ACVR1 gene, though the mechanism by which the ACVR1 was superexpressed has not been very clear. But when we observe the expression of the gene ACVR1 and analyze together with the expression of BMP4, we realized that there was a modulation when the cells were treated with RNAi.

**Keywords:** Fibrodysplasia ossificans progressiva; RNAi; Gene expression.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Iniciadores de Oligonucleotídeos selecionados para PCRrt..... | 34 |
| <b>Tabela 2</b> – Iniciadores de Oligonucleotídeos selecionados para siRNA..... | 36 |
| <b>Tabela 3</b> - Quantificações de cada primer desenhado.....                  | 36 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Hallux Valgus. ....                                                                                                                                                                                     | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Ossificação heterotópica na região dorsal, proximal. ....                                                                                                                                               | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Via geral da sinalização de TGF $\beta$ .....                                                                                                                                                           | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Sinalização da BMP e sua regulação em diferentes níveis. ....                                                                                                                                           | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema da técnica RNAi.....                                                                                                                                                                            | 26 |
| <b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de siRNA de 21pb....                                                                                                                                      | 37 |
| <b>Figura 7.</b> Resultado da viabilidade celular dos siRNA em NPC.....                                                                                                                                                  | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Comparação dos níveis de expressão do mRNA de ACVR1 e BMP4 no controle normal sem e com o veículo de transfecção nanopartícula de carbono.....                                                          | 39 |
| <b>Figura 9.</b> Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos no controle e em células de FOP.....                                                                                                                 | 40 |
| <b>Figura 10.</b> Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos no controle e em células de FOP com o veículo de transfecção nanopartícula de carbono.....                                                          | 41 |
| <b>Figura 11.</b> Expressão dos mRNAs de ACVR1 em PBMC de indivíduos controles normais após transfecção com moléculas siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.....   | 43 |
| <b>Figura 12.</b> Expressão dos mRNAs de ACVR1 em PBMC de indivíduos com FOP após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.....          | 44 |
| <b>Figura 13.</b> Expressão dos mRNAs de BMP4 em PBMC de indivíduos controles normais após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC..... | 45 |
| <b>Figura 14.</b> Expressão dos mRNAs de BMP4 em PBMC de indivíduos com FOP após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.....           | 46 |
| <b>Figura 15.</b> Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos nas células controle .....                                                                                                                          | 47 |
| <b>Figura 16</b> Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos células do paciente.....                                                                                                                             | 48 |
| <b>Figura 17.</b> Reavaliação do silenciamento em genes alvos de controles evidenciando inibição de 60% do ACVR1 do controle.....                                                                                        | 48 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                       |                                                                                                    |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACVR1/ALK2</b>     | Receptor tipo I das BMPs (Activin A, Receptor Type 1)                                              |
| <b>ACVR1(R206H)</b>   | Receptor tipo I das BMPs com a mutação da FOP                                                      |
| <b>ActRIIA</b>        | Receptor tipo II das BMPs                                                                          |
| <b>ActRIIB</b>        | Receptor tipo II das BMPs                                                                          |
| <b>BMP</b>            | Bone Morphogenetic Protein – Proteína Morfogênica Óssea                                            |
| <b>BMPRI1A(ALK3)</b>  | Receptor tipo I das BMPs                                                                           |
| <b>BMPRI1B(ALK6)</b>  | Receptor tipo I das BMPs                                                                           |
| <b>BMPRII</b>         | Receptor tipo II das BMPs                                                                          |
| <b>C2C12</b>          | Células Satélites musculares                                                                       |
| <b>cDNA</b>           | DNA complementar                                                                                   |
| <b>C6H8O6</b>         | Molécula de ácido ascórbico                                                                        |
| <b>Chordin</b>        | Antagonista das BMPs                                                                               |
| <b>COL1</b>           | Colágeno I                                                                                         |
| <b>COL3</b>           | Colágeno III                                                                                       |
| <b>CO2</b>            | Molécula de dióxido de carbono                                                                     |
| <b>DAN</b>            | Antagonista de TGF- $\beta$ e BMP                                                                  |
| <b>dNTP</b>           | Mix contendo as bases nitrogenadas citosina (dCTP), guanina (dGTP), timina (dTDP) e adenina (dATP) |
| <b>DNA</b>            | Ácido desoxirribonucléico                                                                          |
| <b>DNase</b>          | Enzima desoxirribonuclease                                                                         |
| <b>dsRNAs</b>         | <i>Double strand</i> RNA                                                                           |
| <b>FOP</b>            | Fibrodisplasia Ossificante Progressiva                                                             |
| <b>Gly</b>            | Glicina                                                                                            |
| <b>Hyp</b>            | Hidroxiprolina                                                                                     |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | Molécula de água                                                                                   |
| <b>KCl</b>            | Cloreto de potássio                                                                                |
| <b>mL</b>             | Microlitro                                                                                         |
| <b>mRNA</b>           | RNA mensageiro                                                                                     |
| <b>mM</b>             | Milimolar                                                                                          |
| <b>NaOH</b>           | Hidróxido de sódio                                                                                 |
| <b>ng</b>             | Nanogramas                                                                                         |

|                               |                                                                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Noggin</b>                 | Molécula de sinalização do desenvolvimento embrionário, antagonista das BMPs                              |
| <b>NPC</b>                    | Nanopartícula de Carbono                                                                                  |
| <b>NPCPM</b>                  | Nanopartícula de carbono de poros múltiplos                                                               |
| <b>PBMC</b>                   | Peripheral blood mononuclear cell – Células mononucleares de sangue periférico                            |
| <b>PCRrt</b>                  | Polimerase Chain Reaction real time, Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real                         |
| <b>pH</b>                     | Potencial hidrogeniônico                                                                                  |
| <b>pmol</b>                   | picomol                                                                                                   |
| <b>Pro</b>                    | Prolina                                                                                                   |
| <b>RNA</b>                    | Ácido ribonucléico                                                                                        |
| <b>RNAi</b>                   | RNA de interferência                                                                                      |
| <b>RNAiM</b>                  | siRNA para o gene ACVR1 mutado                                                                            |
| <b>RNase</b>                  | Ribonuclease                                                                                              |
| <b>RPMI</b>                   |                                                                                                           |
| <b>RT</b>                     | Transcrição reversa                                                                                       |
| <b>siRNA</b>                  | <i>Small interfering RNA</i>                                                                              |
| <b>SMAD</b>                   | Proteínas envolvidas na sinalização celular ( <i>Drosophila</i> protein, mothers against decapentaplegic) |
| <b>ssRNAs</b>                 | RNAs de fita simples                                                                                      |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Transforming Growth Factor beta, Fator transformador de crescimento beta                                  |
| <b>Tris-HCl</b>               | tris(hidroximetil aminometano - clorídrico)                                                               |
| <b>SYBR-Green</b>             | Fluoróforo marcador para PCRtr                                                                            |
| <b>S26</b>                    | Proteína ribossomal, utilizado como normalizador da reação de PCR                                         |
| <b><math>\mu</math>L</b>      | Micro litros                                                                                              |
| <b>°C</b>                     | Graus celsius                                                                                             |
| <b><math>\Delta</math>CT</b>  | Delta CT                                                                                                  |

## ÍNDICE

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                            | <b>16</b> |
| 1.1 Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) .....                                                                | 16        |
| 1.2 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) .....                                                                      | 18        |
| 1.3 Diferenciação osteogênica e via de sinalização das BMPs normais ...                                               | 20        |
| 1.4 Diferenciação osteogênica ectópica na FOP e Via de sinalização das BMPs .....                                     | 22        |
| 1.5 Perspectivas Terapêuticas na FOP .....                                                                            | 24        |
| 1.6 A Interferência por RNA (RNAi) .....                                                                              | 25        |
| 1.7 Aplicações da Técnica de Interferência por RNA (RNAi) na genômica funcional e tratamento de doenças humanas ..... | 28        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>                                                                                         | <b>29</b> |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                                                             | <b>30</b> |
| 3.1 Objetivo Geral .....                                                                                              | 30        |
| 3.2 Específicos .....                                                                                                 | 30        |
| <b>4. METODOLOGIA .....</b>                                                                                           | <b>31</b> |
| 4.1 Amostras .....                                                                                                    | 31        |
| 4.2 Obtenção de células mononucleares por cultivo primário de sangue periférico (PBMC) .....                          | 31        |
| 4.3 Cultivo celular e aplicação da técnica de RNA de interferência .....                                              | 32        |
| 4.3.1 Cultivo celular .....                                                                                           | 32        |
| 4.3.2 Síntese de siRNA para ACVR1 mutado e não mutado .....                                                           | 32        |
| 4.3.3 Tratamento das células com siRNA para ACVR1 mutado e não mutado .....                                           | 33        |
| 4.3.4 Avaliação da viabilidade celular .....                                                                          | 33        |
| 4.4 Estudo da expressão de RNA mensageiros (mRNA) .....                                                               | 34        |
| 4.4.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase .....                                                              | 34        |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2     | Oligonucleotídeos iniciadores específicos .....                                                                                                                                                                                                                                     | 34        |
| 4.4.3     | Transcrição reversa (RT).....                                                                                                                                                                                                                                                       | 35        |
| 4.4.4     | PCR em tempo real (PCRtr) .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 36        |
| 4.5       | Análise estatística: .....                                                                                                                                                                                                                                                          | 36        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>38</b> |
| 5.1       | Resultados do estudo e seleção oligonucleotídeos iniciadores para síntese de dsRNA das regiões mutada e normal do gene <i>ACVR1</i> para ensaios de RNAi em modelo PBMC. ....                                                                                                       | 38        |
| 5.2       | Resultado do controle positivo do siRNA duplex:.....                                                                                                                                                                                                                                | 39        |
| 5.3       | Resultados da viabilidade celular no modelo in vitro de PBMC de pacientes com FOP e indivíduos controles através de cultivo primário para transfecção de siRNA em nanopartículas de carbono (NPC). ....                                                                             | 39        |
| 5.4       | Resultados da expressão dos genes alvos, <i>ACVR1</i> e <i>BMP4</i> , em PBMC de indivíduos controles normais e PBMC de indivíduos com FOP em seu estado basal e quando submetidas à nanopartícula de carbono (NPC). ....                                                           | 40        |
| 5.5       | Resultados da expressão dos mRNAs de <i>ACVR1</i> em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para <i>ACVR1</i> (R206H) e após transfecção com moléculas de siRNA para <i>ACVR1</i> não mutado, carregadas por NPC. .... | 44        |
| 5.6       | Resultados da expressão dos mRNAs de <i>BMP4</i> em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para <i>ACVR1</i> (R206H) e após transfecção com moléculas de siRNA para <i>ACVR1</i> não mutado, carregadas por NPC. ....  | 46        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>51</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>52</b> |
|           | <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>63</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP)

É uma doença genética autossômica dominante complexa, caracterizada por malformações esqueléticas congênitas (Figura 1) e ossificação heterotópica progressiva (Figura 2), induzida por processo inflamatório agudo, *flare-up* (KAPLAN; PIGNOLO; SHORE;2009). Com uma prevalência estimada de cerca de 1: 2 milhões, é descrita em todo o mundo, sendo que no Brasil há cerca de 75 pacientes registrados na Associação Brasileira de FOP (CARVALO *et al.*,2010; SHORE *et al.*,2005; FOP BRASIL, 2013).



**Figura 1** - Hallux Valgus. Fonte: PALHARES *et al.*, 2015.



**Figura 2** – Ossificação heterotópica na região dorsal, proximal.  
Fonte: PIGNOLO *et al.*, 2011.

Os pacientes com a FOP Clássica apresentam uma mutação em heterozigose (c.617G>A, p.R206H) no gene do receptor da ativina 1 (*ACVR1*), também conhecido como gene do receptor *tipo quinase* da ativina 2 (*ALK2*),

localizado no cromossomo 2q23-24. Diferentes mutações no *ACVR1* foram descritas em fenótipos variantes, no entanto todos os casos esporádicos ou familiares de FOP clássica apresentam a mutação R206H (SHORE; *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2006; NAKAJIMA *et al.*, 2007; FURUYA *et al.*, 2008; BOCCIARDI *et al.*, 2009; KAPLAN *et al.*, 2009).

O receptor *ACVR1* (*ALK2*) é um dos receptores Tipo I das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A consequência da alteração neste receptor será detalhada a seguir. A fisiopatologia da FOP tem sido um grande desafio dos últimos anos, pois envolve desregulação da via de sinalização das BMPs, interação destas com várias vias metabólicas e ativação do sistema imunológico (KAPLAN *et al.*, 2009).

## 1.2 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)

As BMPs são membros da superfamília do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a qual compreende um grande número de proteínas que sinalizam vias através de receptores citoplasmáticos constituídos por um domínio serino/treonina quinase. Os membros desta superfamília podem exercer efeito inibitório ou estimulatório sobre as células, dependendo do estágio de diferenciação celular em que venham atuar (KAPLAN *et al.*, 2009).

As BMPs constituem a família de moléculas sinalizadoras extracelulares, fortemente conservadas que regulam a diferenciação das células progenitoras mesenquimais em vários tipos de células, e participam do desenvolvimento dos vertebrados ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)). Entre os membros desta família estão: BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9, BMP10, BMP11(GDF11) (EPSTEIN; ERICKSON; SHORE; 2009; [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)). As BMPs são expressas em diferentes locais e apresentam diferentes funções: as BMP2, BMP3, BMP4, BMP5 e BMP7 são expressas no pericôndrio; BMP2 e BMP6 são expressas em condrócitos hipertróficos; BMP2, BMP6, GDF5 e GDF6 estão expressas no desenvolvimento das articulações (EPSTEIN; ERICKSON; SHORE; 2009).

A BMP2 está relacionada à diferenciação dos osteoblastos e diferenciação de células T, também expressa no líquido sinovial, na derme e tecido subcutâneo. A BMP3 (osteogenina) está envolvida com o padrão de formação do esqueleto embrionário e antagoniza a BMP2 independente de receptor de BMP. A BMP4 é uma molécula reguladora vital que funciona durante todo o período de desenvolvimento na indução do mesoderma, desenvolvimento de dentes e formação dos membros. Está relacionada à indução óssea e reparo de fraturas, também expressa no mesênquima intraviloso do intestino e está envolvida na diferenciação dos adipócitos e células T (EPSTEIN; ERICKSON; WYNshaw-BORIS; 2004; [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)).

A BMP5 induz a osteogênese endocondral, também é expressa nas células ganglionares cervicais superiores do embrião. A BMP6 (VGR1) relacionada com a diferenciação osteoblástica e também com a regulação endógena da expressão de hepcidina e no metabolismo do ferro. A BMP7 (OP1) embora mais fraca que BMPs 2, 6 e 9, é uma indutora dos marcadores da diferenciação osteogênica nas células pluripotentes e tronco-mesenchimais, além de participar na diferenciação dos adipócitos. (EPSTEIN; ERICKSON; WYNshaw-BORIS; 2004; [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)).

A BMP8 (OP2) foi detectada no tecido esquelético em desenvolvimento, enquanto a BMP9 (GDF2) se expressa em células endoteliais hepáticas e de Kupffer. Esta última está também envolvida na diferenciação de neurônios colinérgicos do SNC, induz a fosforilação da via SMAD1/5/8 nas células microvasculares endoteliais humanas, e, embora menos que as demais BMPs, também induz todos os marcadores de diferenciação osteoblástica nas células tronco-mesenchimais e pluripotentes. BMP10 tem uma importante função na trabeculação do coração embrionário e BMP11 (GDF11) está envolvida na embriogênese precoce com a padronização do eixo axial anterior/posterior do embrião, expressa na estria primitiva e regiões do broto caudal controlando células ganglionares da retina. (EPSTEIN; ERICKSON; WYNshaw-BORIS; 2004; [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)).

As BMPs estimulam a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, são inibidas na diferenciação miogênica, e podem estimular ou inibir a diferenciação dos adipócitos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)). Muitos inibidores da sinalização das BMPs são expressos no desenvolvimento inicial do embrião e estão envolvidos em eventos importantes de indução neural e lateralização do embrião (KAPLAN *et al.*, 2009).

### **1.3 Diferenciação osteogênica e via de sinalização das BMPs normais**

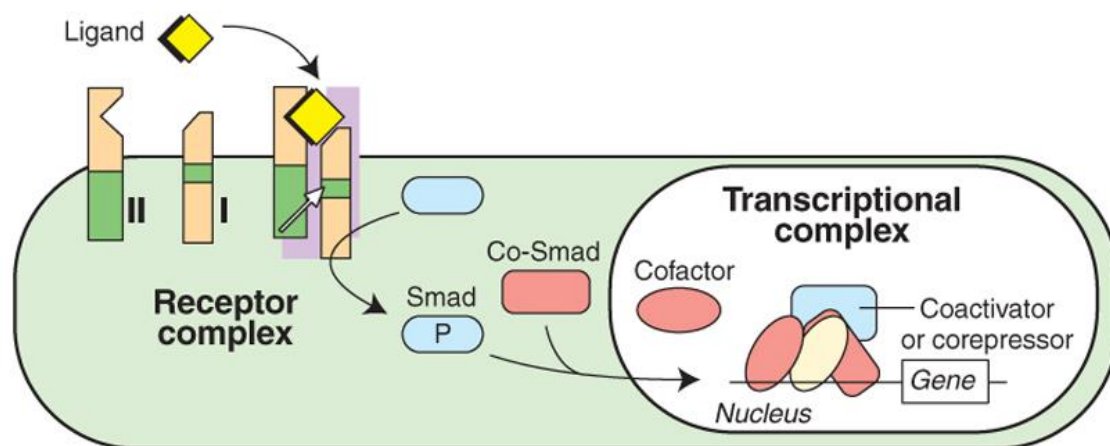
As BMPs agem através de um complexo caminho de sinalização bioquímica, presente em grande parte dos tecidos desde a vida embrionária até a vida adulta. Esta ação ocorre por ação e ativação de complexos heterotetraméricos trans-membrana (receptores Tipo I e Tipo II). Os receptores Tipo I são: BMPR1A(ALK3), BMPR1B(ALK6), ACVR1(ALK2); e os receptores Tipo 2: BMPRII, ActRIIA e ActRIIB. ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)).

Os receptores Tipo I apresentam uma característica em comum que é uma região rica em glicina e serina (domínio GS), considerada região crítica para ativação da via que culminará com a transcrição das BMPs. Eles são codificados por genes diferentes em regiões diferentes do genoma, encontrados em vários tecidos e apresentam expressão diferencial entre os mesmos: o BMPR1A(ALK3) é encontrado quase que exclusivamente no sistema esquelético humano; o BMPR1B(ALK6) encontrado em muitos tecidos mas em altas concentrações na próstata e cérebro; o ACVR1(ALK2) é fortemente expresso na placenta, sistema músculo-esquelético e coração, pouco menos em rins, cérebro e pulmões. (TEM *et al.*, 1993; IDE *et al.*, 1997).

Os receptores Tipo II atuam em conjunto com os receptores Tipo I. O domínio GS dos receptores Tipo I é o sítio para a transferência da fosforilação do receptor Tipo II para o receptor Tipo I. Esta fosforilação ocorre pela adição de serinas e treoninas pelos receptores Tipo II. Durante este processo de ligação dos receptores, metade do domínio GS é fosforilado e ocorre uma mudança estrutural ao redor desse domínio que desvincula a proteína de ligação FKBP1A/FKBP12 do domínio GS, cuja função é justamente estabilizar o receptor quando ele não está fosforilado e regular a concentração destes na

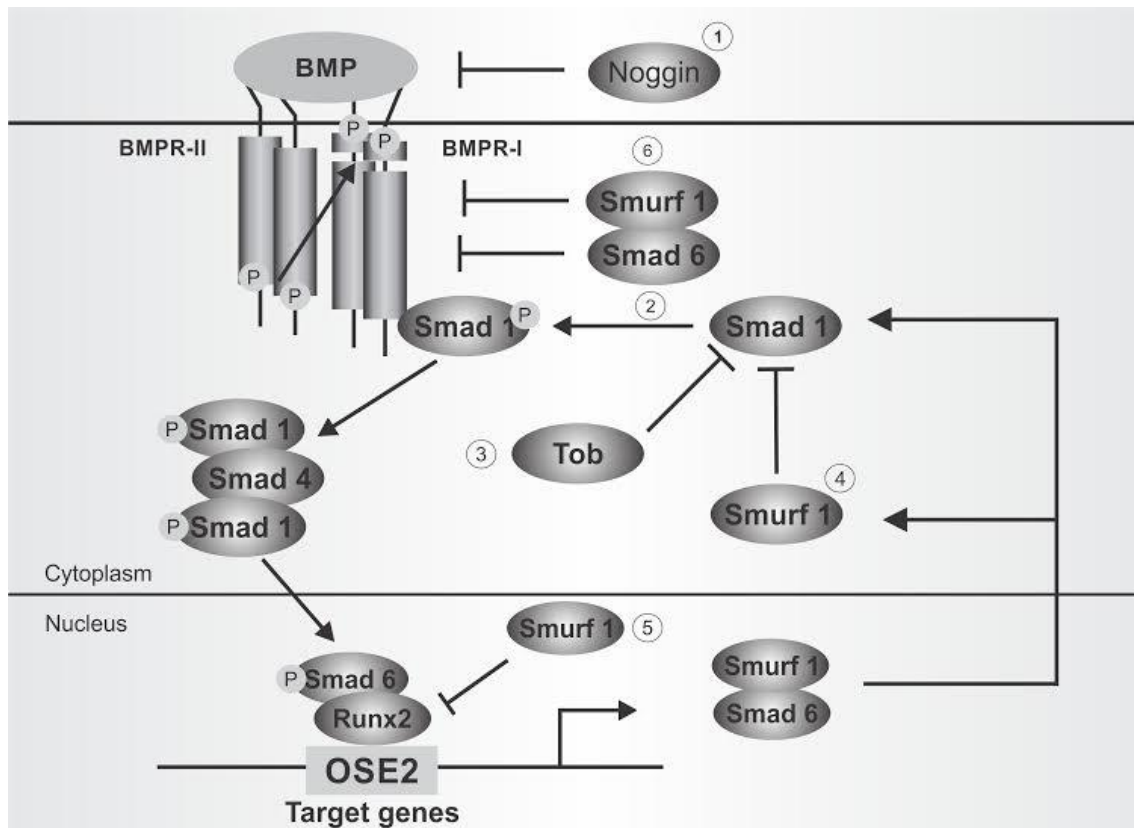
membrana celular ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)). Esta nova estrutura, formada a partir da fosforilação dos receptores Tipo I e Tipo II, se liga e ativa a sinalização de algumas das nove proteínas da família chamada SMAD e que regula a transcrição nuclear da BMP responsiva a genes alvo ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2015)).

A ativação da via Smad ocorre da seguinte forma: a estrutura de receptores Tipo I / Tipo II interage com Smad 1,5 e 8, e assim fosforilam as Smad 2 e 3, as quais se associam com a Smad 4 (co-Smad) formando o complexo R-Smad/Co-Smad que apenas assim poderá ser translocado para o núcleo, onde modulará a transcrição de BMP. As Smad 6 e 7 (I-Smads) são induzidas para inibir a sinalização, pois quando se ligam ao receptor Tipo I não podem ser fosforiladas e desligadas do receptor. Elas recrutam o fator Smurf 1 ao receptor Tipo I e promove ubiquitinação deste receptor (YAMAGUCHI *et al.*, 2006). Esta via é auto regulada e qualquer alteração em um dos receptores e ligantes pode comprometer a sinalização (Figuras 3 e 4).



**Figura 3:** via geral da sinalização de TGFβ. O Ligante ativa os receptores e fosforila a Smad ativando esta via (Schoenwolf *et al.* *Larsen's Human embryology*, 4ª Ed.).

A seguir detalha-se a sua auto-regulação.



**Figura 4:** Sinalização da BMP e sua regulação da BMPs em diferentes níveis moleculares: 1) Noggin, antagonista das BMPs que bloqueiam sua sinalização no meio extracelular; 2) Smad6, liga-se ao receptor Tipo I e impede a ligação de Smad 1,5,8; 3) Tob, interage especificamente com proteínas Smad ativada por BMP, inibindo sua sinalização; 4) Smurf realiza a ubiquitinação dos receptores e fator de transcrição Runx2 (adaptado de Chen *et al*, 2004).

#### 1.4 Diferenciação osteogênica ectópica na FOP e Via de sinalização das BMPs

Na fisiopatologia da FOP, a via de sinalização das BMPs está comprometida porque a mutação ocorre no receptor Tipo I da BMP. A alteração desta via no embrião justificaria as anomalias congênitas múltiplas, e na vida pós natal, justifica a ossificação heterotópica (KAPLAN; TABAS; ZASLOFF,1990).

Vários achados reforçam o envolvimento da via da BMP na ossificação heterotópica: 1] aumento da expressão de BMP4, 2] falha na inibição dos antagonistas, 3] falha na regulação das BMPs no espaço extracelular, 4] expressão de BMPs em células fibroproliferativas de lesões precoces de FOP, 5] aumento da concentração de receptores Tipo I na superfície celular, 6] falha na internalização e degradação destes receptores, 7] sinalização das BMPs presente em pacientes com FOP mesmo na ausência de BMP, 8] desregulação da sinalização BMP-independente, através da via SMAD, 9] desregulação da sinalização BMP-dependente, através da via SMAD e da via MAPK (KAPLAN; PIGNOLO; SHORE;2009).

A mutação do gene do ACVR1(R206H) é uma mutação de ganho de função, pois ele ativa a via de sinalização das BMP independente do ligante (BMP), e também funciona como receptor de BMP independente do receptor Tipo II (FUKUDA *et al.*,2009). Para ele ativar a via é necessário que esteja fosforilado, portanto o ACVR1(R206H) não está ativado o tempo todo, e sua ativação está relacionada aos processos inflamatórios, que precedem o desenvolvimento da ossificação heterotópica (HEBELA, SHORE, KAPLAN, 2005; GROPE, SHORE, KAPLAN, 2007; YU *et al.*, 2008; KAPLAN *et al.*, 2007; KAN *et al.* 2009; Lounev *et al.*, 2009).

Este gatilho que inicia todo o processo da ossificação heterotópica, é resultado da alteração no pH decorrente da hipóxia tecidual. Em modelo animal e celular, quando ocorre a hipóxia tecidual, a alteração no pH ativa o receptor ACVR1 mutado, independente do ligante (BPM) e ocorre a formação óssea heterotópica (OLMSTED-DAVIS *et al.*, 2007; WANG ET *et al.*, 2008).

Esta alteração é sustentada por outro estudo, no qual identificaram no modelo ACVR1/ALK2 tipo selvagem (*in Silico*), que a arginina, conservada no codon 206 forma uma ponte salina estável com um resíduo de aspartato no códon 269. Mas, quando ocorre a substituição de arginina por histidina no resíduo 206, somente sob pH intracelular reduzido (ácido), a histidina participará da ponte salina com o aspartato no resíduo 269, e com enorme rearranjo estrutural (GROPE; SHORE; KAPLAN, 2007). Portanto, supõem-se que a substituição da arginina pela histidina na mutação da FOP, cria uma

alteração dentro do domínio do receptor que é pH-sensível, ativando este receptor independente da BMP, e isto explica porque alterações como infecções, traumas são o gatilho necessário para ativar a via que resultará na ossificação heterotópica.

Ativado, o ACVR1(R206H) induz a atividade da fosfatase alcalina nas células satélites musculares (C2C12), que inibe os antagonistas da BMP4 no músculo, aumentando, consequentemente a concentração da BMP4 envolvida na formação de osteoblastos (AKIYAMA *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2003; SHORE *et al.*, 2006; FUKUDA *et al.*, 2009, SHEN *et al.*, 2009). Além de induzir a atividade da fosfatase alcalina, o ACVR1(R206H) ativado induz a sinalização das BMPs via Smad, independente dos receptores Tipo II. Isto foi observado quando em células C2C12 com o ACVR1(R206H) ocorreu a sinalização da BMP via fosforilação de Smad1/5/8 mesmo na ausência do receptor Tipo II (FUKUDA *et al.*, 2009). A falha na regulação das BMPs no espaço extracelular, desregula a sinalização BMP através da via SMAD e esta sequência de eventos que se retroalimentam, resultarão na condrogênese ectópica.

## 1.5 Perspectivas Terapêuticas na FOP

O desenvolvimento de abordagens e intervenções terapêuticas na FOP é de importância clínica não só para FOP, mas também para as formas mais comuns de ossificação heterotópica. Estas abordagens devem ser realizadas considerando a fisiopatologia da FOP em pelo menos quatro linhas com a finalidade de: 1] bloquear os alvos inflamatórios, 2] alterar a indução e/ou condução dos microambientes que promovem a ossificação heterotópica, 3] bloquear a resposta das células progenitoras dos tecidos conjuntivos e 4] bloquear a atividade do receptor mutante da FOP (KAPLAN; PIGNOLO; SHORE; 2009).

O manejo dos *flare-ups* da doença tem sido publicado por vários autores, e incluem antiinflamatórios não esteroidais, inibidores da ciclo-oxigenase 2, inibidores leucotrienos, estabilizadores de mastócitos, ácido ascórbico, bifosfonados e rosiglitazone (PALHARES, 1997; PALHARES, LEME, 2001; PALHARES *et al.*, 2010; BOCCIARDI; RAVAZZOLO, 2010;

GATTI *et al.*, 2010; KAPLAN *et al.*, 2008). Estes estudos mostram que a mudança no microambiente onde ocorre o processo inflamatório, que é gatilho para a ossificação heterotópica, é mais eficiente no controle dos *flare-ups* se iniciada o mais precoce possível e com agentes que influenciam tanto na resposta inflamatória como também no processo de ossificação (PALHARES, 1997; PALHARES, LEME, 2001; PALHARES *et al.*, 2010).

Identificação de pequenas moléculas inibidoras da sinalização das BMPs, as dorsomorfina e seus derivados, assim como inibidores da via Smad, tem sido foco de estudos para inibição do ACVR1(R206H) nas células mesenquimais. Nos anos seguintes à descoberta da mutação no ACVR1(R206H) em 2006, e principalmente nestes últimos, a busca por perspectivas terapêuticas na FOP gerou grande avanço no entendimento da fisiopatologia molecular do ACVR1 e com isto forneceu perspectivas terapêuticas para a FOP. A grande limitação do avanço das terapêuticas na linha de inibição do ACVR1 através das moléculas da via das BMPs é que não inibe apenas o ACVR1 mutado e sim todos os receptores tipo I, e o ACVR1 (R206H) apresenta um ganho de função e age por várias vias. (FISHMAN *et al.*, 2005; FIORI *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008; KAPLAN *et al.*, 2008; KAPLAN; PIGNOLO; SHORE; 2009; FUKUDA *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2009; VAN *et al.*, 2010).

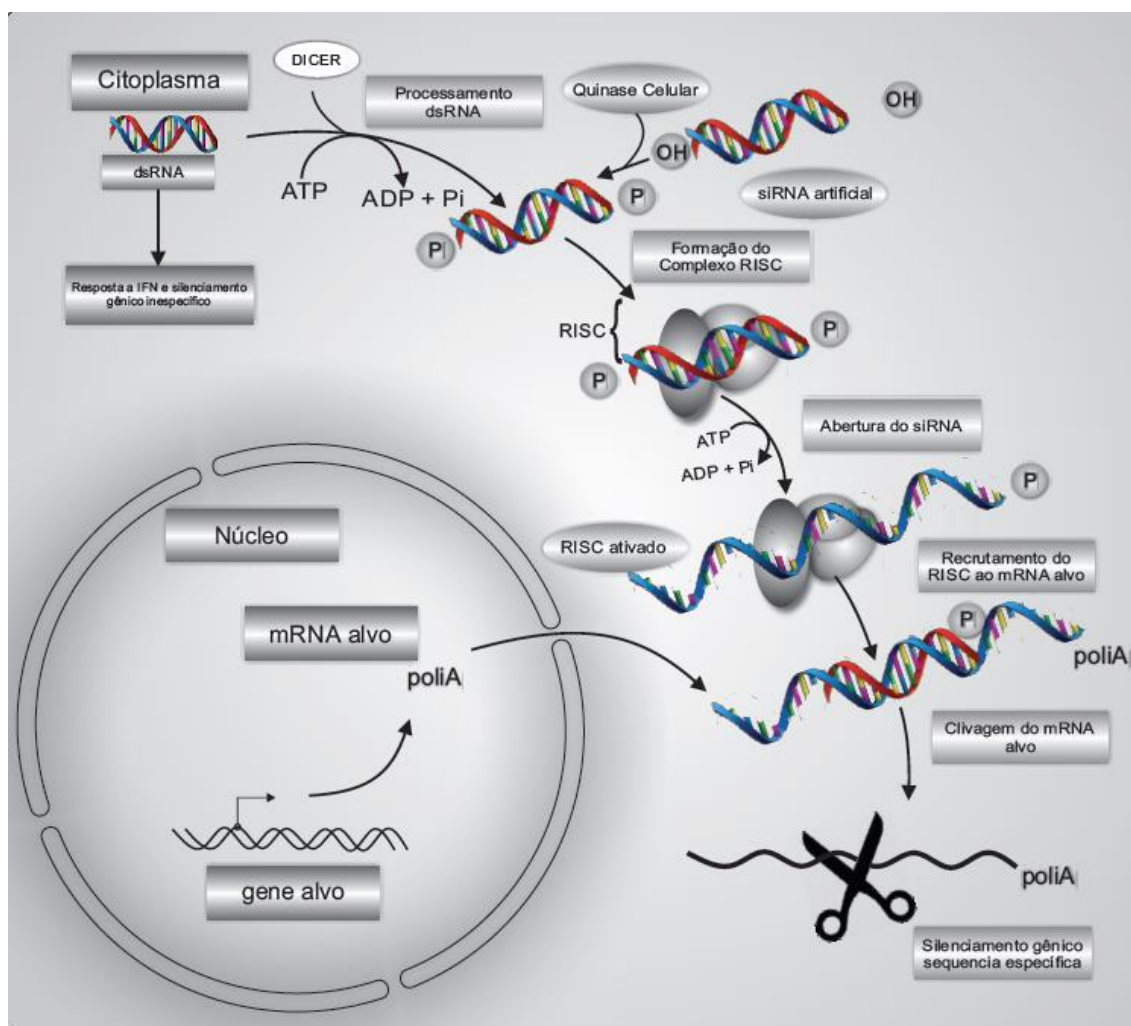
## 1.6 A Interferência por RNA (RNAi)

A interferência mediada por RNA (RNAi), é um processo pós transcricional que naturalmente ocorre nos organismos eucariotos e parece exercer, primordialmente, um papel na defesa do organismo (BAULCOMBE, 1999; TABARA *et al.*, 1999; KETTING *et al.*, 1999). Este mecanismo biológico pré-existente no organismo é conhecido por *silenciamento gênico pós-transcricional* (PTGS). O PTGS é uma via natural de defesa que atua identificando e degradando moléculas de RNA estranhas ao transcriptoma da célula sadia. Uma dessas moléculas é o RNA de dupla fita (“double strand RNA” – dsRNA), naturalmente gerada na replicação viral, na mobilização de elementos transponíveis ou para eliminar produtos de

transcrições anômalas, sendo reconhecidas como sinal de perigo ou alerta. Esses dsRNAs levam à destruição de RNAs de fita simples (ssRNAs) similares em sequência (PEREIRA,2005).

A RNAi é uma técnica que se utiliza de uma via endógena para promover um silenciamento gênico por bloqueio da tradução dos seus transcritos. Pode ser utilizada para identificar as funções dos genes, as interrelações de diferentes produtos de vias metabólicas e bloquear a expressão de um gene.

O início do processo da RNAi ocorre quando uma endoribonuclease do tipo III citoplasmática denominada *Dicer* cliva os pequenos dsRNAs identificados em pequenos duplexes de 21~25 nucleotídeos, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNA - *small interfering RNAs*). Esses, correspondem às fitas sense e antisense do RNA alvo, e apresentam um grupo fosfato na extremidade 5'- e dois nucleotídeos *não pareados* na extremidade 3'-OH. Os siRNAs são reconhecidos por uma proteína R2D2 com afinidade por duplexes de RNA que fica acoplada à *Dicer*. A R2D2 age como um *sensor da estabilidade termodinâmica das extremidades* do siRNA, posiciona-se e liga-se ao oligo do duplex cuja extremidade 5'- é mais estável, em consequência, uma proteína com atividade de RNA helicase (*Dicer* ou alguma outra proteína específica) separa as duas fitas de siRNA. O oligonucleotídeo com extremidade 5' menos estável, é *preferencialmente* transferido para Slicer (uma endoribonuclease), permitindo assim a ação do *complexo de silenciamento induzido por RNA* (RISC), que efetivará o silenciamento gênico. A formação deste complexo é ATP-dependente e procede através de uma série de subcomplexos intermediários, busca no transcriptoma um RNA complementar a fita funcional associada a ele e, depois de identificado, o RNA alvo é clivado por RISC e degradado, promovendo o silenciamento gênico. A fita funcional permanece intacta e associada ao complexo, permitindo sua utilização no silenciamento de no mínimo mais outros nove RNAs (ARAUJO,2008) **(Figura 5).**



**Figura 5:** Esquema da técnica RNAi Adaptada de Stevenson, Nat. Ver. Imuno. 3,851-858,2003: RNAs dupla-fita longos são processados pela enzima *Dicer* tornando-se siRNAs. A fita *antisense* dos siRNAs é incorporada no complexo *RISC* guiando-o ao mRNA alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o.

O desenvolvimento de tecnologia de interferência por RNA (RNAi) avançou muito nos últimos anos, mas um dos grandes desafios para explorar seu potencial pleno é aprimorar as técnicas de entrega celular destes siRNAs, pois eles apresentam rápida degradação no ambiente extracelular e não são eficientemente internalizados nas células (LADEIRA *et al.*,2010). A utilização de veículos de entrega dos siRNA é essencial para a prática silenciamento mediado por siRNA, pois além de estabelecer a forma como eles serão integrados na célula conferem maior estabilidade do siRNA para que este exerça a função desejada sem efeitos tóxicos (DRAZ *et al.*,2014).

Uma nova abordagem para administração celular de siRNA utilizando o sistema de entrega é a utilização de nanotubulos de carbono (NTC) que demonstra sucesso devido a toxicidade inespecífica sem efeitos colaterais aparentes para várias aplicações *in vitro*. Além disto, apresenta eficiência de transfecção superior a 95% e índice de silenciamento que varia de 40% a mais de 80% em diferentes tipos de células, incluindo células difíceis de transfectar, como célula neuronal e cardiomiócitos (LADEIRA *et al.*,2010). Em células PBMC, quando usado a NPC o silenciamento fica em torno de 60% (DRAZ *et al.*,2014).

### **1.7 Aplicações da Técnica de Interferência por RNA (RNAi) na genômica funcional e tratamento de doenças humanas**

A RNAi vem sendo usado como uma ferramenta poderosa para análise sistemática da função gênica, silenciamento gênico com o objetivo de combater alguns patógenos como vírus da influenza e da hepatite B, malária, *Schistosoma mansoni*, HIV, alguns tumores, além da possibilidade desta técnica de ter uma função terapêutica em doenças genéticas, como Huntington, e até mesmo em doenças que seja necessário o silenciamento apenas do alelo mutado, como é o caso da esclerose lateral amiotrófica, utilizando uma terapia aleloespecífica (MOHMMED ET AL., 2003; TOMPKINS *et al.*, 2004; HARPER *et al.*, 2005; UPRICHARD *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; ARAUJO,2008; LACERDA, 2008; MAGALHÃES *et al.*,2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença genética rara que tem fornecido uma visão única dos princípios genéticos, moleculares e celulares da desregulação da sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) na via de desenvolvimento e reparo tecidual, principalmente há 5 anos, após a descoberta do gene supostamente envolvido na fisiopatologia da doença.

A técnica de interferência por micro-RNA (RNAi) tem revolucionado a biologia molecular desde o final do século vinte, por ser uma ferramenta eficiente na análise sistemática da função gênica (PEREIRA, 2005). A estratégia de inibir o ACVR1 (R206H) por siRNA, que está sendo cogitada por alguns pesquisadores, representa um grande desafio e é muito promissora (KAPLAN, PIGNOLO, SHORE, 2009). E na nossa opinião, esta é uma forma efetiva de se estudar o desequilíbrio das funções gênicas na FOP e de futuras abordagens terapêuticas desta doença.

Portanto, com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre a fisiopatologia molecular e com isto encontrar uma alternativa terapêutica para esta doença e talvez para as demais formas de ossificação heterotópica, aplicaremos a técnica de RNAi na investigação molecular da FOP em modelo *in vitro* de PBMC.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Determinar um modelo experimental para o silenciamento da expressão gênica do *ACVR1* (R206H) em cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário e o efeito do siRNA sobre a expressão de *ACVR1* e *BMP4*.

#### 3.2 Específicos

1. Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para síntese de dsRNA das regiões mutada e normal do gene *ACVR1* para ensaios de RNAi em modelo PBMC.
2. Utilizar o modelo *in vitro* de PBMC de pacientes com FOP e indivíduos controles através de cultivo primário para transfecção de siRNA em nanopartículas de carbono (NPC).
3. Avaliar a expressão dos mRNAs de *ACVR1* e *BMP4* em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para *ACVR1* (R206H), carregadas por NPC.
4. Avaliar a expressão dos mRNAs de *ACVR1* e *BMP4* em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para *ACVR1* não mutado, carregadas por NPC.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Amostras

Para cultivo de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram utilizadas amostras de sangue total periférico, coletado por punção venosa antecubital, proveniente de indivíduos voluntários (portadores de FOP [n=6] e indivíduos controles sadios [n=6]). A coleta dos pacientes foi realizada em três diferentes cidades/Estados, e foi programada para ser realizada no mesmo horário. Para cada dupla foi deslocado um coletador que transportou a amostra para o laboratório. Os indivíduos controles sadios foram selecionados aleatoriamente. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos vacutainer heparinizados, mantidas a 4°C por até 24 horas antes do seu processamento.

Todos os participantes doadores voluntários foram devidamente esclarecidos e assinaram o termo de consentimento (TCLE) **(ANEXO1-3)**.

Este projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul sob o parecer N° 814.800 **(ANEXO 4)**.

### 4.2 Obtenção de células mononucleares por cultivo primário de sangue periférico (PBMC)

O método utilizado para a separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi descrito por Gazzinelli *et al.* (1983) com algumas modificações. Resumidamente, aproximadamente 15 ml de sangue heparinizado foram transferidos para tubo Falcon de 50 ml, contendo uma mistura de Ficoll-diatrozoato, obtida comercialmente (Histopaque® - 1077, Sigma® 10771), na proporção de uma parte de Ficoll-diatrozoato para duas partes de sangue. O anel de leucócitos foi obtido por gradiente em ficoll, através da centrifugação por 40 minutos a 1400 rpm (~1000g) à temperatura ambiente com especificação de aceleração máxima (9) e frenagem mínima (1) em centrífuga de alta rotação marca HIMAC CR21E Hitache®). Após centrifugação, as células mononucleares foram coletadas na interface entre o

plasma e o Ficoll-diatrozoato, em seguida transferidas para novos tubos e lavadas por três vezes em meios de cultivo, sendo duas vezes em meio DEMEM estéril (Gibco® pH, 7,2 a 7,4) e uma vez em meio RPMI 1640 completo (10% soro fetal bovino + L-glutamina + gentamicina + streptomicina, pH 7,4) (Gibco® pH, 7.2 a 7,4). A lavagem das células foi realizada a 1200 rpm (~800g) / 7 minutos/ 4°C. As células foram ressuspensas em 1mL de Meio RPMI completo. A densidade celular foi ajustada para concentração desejada, após contagem celular com Azul de Tripán em Câmara de Neubauer. Todos os procedimentos que necessitaram de condições estéreis foram realizados em capela de fluxo laminar (BIOSEG® 12, Grupo VECO).

### **4.3 Cultivo celular e aplicação da técnica de RNA de interferência**

#### **4.3.1 Cultivo celular**

O cultivo celular foi realizado em placa de 96 poços, sendo 180 microlitros da suspensão celular ( $\sim 3 \times 10^5$  células) cultivados e estabilizados por 24 horas em meio RPMI 1640 completo, mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C (Thermo scientific/Forma Series II Water Jacket CO<sub>2</sub> incubator).

#### **4.3.2 Síntese de siRNA para ACVR1 mutado e não mutado**

Para os estudos de siRNA, potenciais sítios alvo dentro do gene de *Homo Sapiens* activin A receptor type I (NCBI: XM\_005246939.1), foram selecionados e posteriormente, avaliados quanto a especificidade no NCBI Blast.

Para a síntese dos siRNAs utilizou-se o Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion® by life technologies™), utilizando os seguintes oligonucleotídeos: ACVR1 senso 5' AACAGTGGCTCGCCCAGATTAC 3', ACVR1 anti senso 5' AAGTAATCTGGCGAGCCACTG 3', ACVR1 mutado senso 5' AACAGTGGCTCACCCAGATTAC 3' e ACVR1 mutado anti senso 5' AAGTAATCTGGTGAGCCACTG 3'.

#### **4.3.2.1 Controle positivo da reação**

Para verificar a eficiência da reação de síntese do siRNA, uma alíquota do siRNA foi aplicada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo segundo protocolo do Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion® by life technologies™). A imagem foi capturada no L-PIX (LOCCUS® Biotecnologia). Os primers desenhados foram quantificados verificando assim sua pureza pelo gel.

#### **4.3.3 Tratamento das células com siRNA para ACVR1 mutado e não mutado**

As células foram tratada com os siRNAs sintetizados, conforme descrito por Ladeira *et al* (2010) com algumas modificações, sendo, resumidamente, 100 nM de siRNA funcionalizados com 0,025mg/mL de NTCPM, após 24 horas do cultivo e estabilização celular. Os NTCPM foram gentilmente cedidos pelo professor Luiz Orlando Ladeira (Departamento de Física da UFMG), e foram funcionalizados a partir da sonicação em ultrassom (Ultracelaner 800, Unique, Brasil) por 3 horas e em seguida foram sonicados novamente por 30 minutos com os respectivos siRNA em meio RPMI suplementado.

Foram adicionados 20 µL de Meio RPMI com NTCPM funcionalizado com siRNA, dentro dos 180 µL da cultura. Esse tratamento foi realizado em triplicata para avaliação de viabilidade celular e em quadruplicata para PCR em tempo real. As células ficaram em tratamento por 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.4 Avaliação da viabilidade celular**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com O'Brien *et al*, (2000) com modificações. A resazurina, de cor azul e não fluorescente, quando adicionada a cultura de células é convertida para a forma reduzida resorufina, de cor rosa e fluorescente, que pode ser medida por calorimetria ou fluorimetria. 20µL de uma solução de resazurina a 0,6mM foi adicionada a cada

poço, e as placas incubadas durante 6 horas. Posteriormente, a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda 570 e 600nm em leitor de placas (Molecular Devices®). Foi avaliada a viabilidade com nanotúbos também.

Além disto, a viabilidade celular foi concomitantemente, avaliada pela contagem de células com azul de tripan após 48 horas de tratamento com siRNA.

#### **4.4 Estudo da expressão de RNA mensageiros (mRNA)**

##### **4.4.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase**

Para cada extração do RNA total utilizou-se um *pool* de 4 poços das células do cultivo (1200000 células) de cada indivíduo. Foram avaliadas células tratadas e não tratadas com siRNA. Para obtenção do RNA total, as células foram transferidas da placa para tubos de microcentrífuga tipo ependorff de 1,5 mL, centrifugadas imediatamente a 400g (centrífuga refrigerada de bancada, 3K30 Sigma®) por 15 minutos, para concentração do *pelet* de células. Em seguida, o RNA total foi extraído utilizando-se reagente Stat-60®, segundo protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total ressuspense em 25 ou 50 µl de água DEPC tratada, foi quantificado em 260 nm (NanoVue Plus Spectrophotometer GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se uma alíquota de 2 µl. Alíquotas de amostras de RNA total foram em seguida, tratadas com *Dnase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico, extraídas com fenol, precipitadas com isopropanol e o pellet de RNA dnase tratado foi lavado com etanol e ressuspense em H<sub>2</sub>O DEPC. Após este tratamento as alíquotas foram requantificadas em 260 nm para posterior utilização no RT-PCR.

##### **4.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores específicos**

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (PCRtr) foram estudados, desenhados e

selecionados a partir de análises das sequências descritas no *GeneBank*, utilizando-se o programa Blastn do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Os iniciadores foram mandados sintetizar na empresa IDT (Integrated DNA technologies; <http://www.idtdna.com>). Os *primers* foram recebidos liofilizados, ressuspensos em H<sub>2</sub>O S.F. e aliquotados para armazenamento a -20°C em estoques de 100 pmol/μl. Soluções de primers para uso foram diluídas a 10 pmol/μl. O controle endógeno normalizador utilizado foi o gene S26 (VINCENT, MARTY, FORT, 1993), sendo os *primers* específicos previamente padronizados no NUFIGEN/ICB-UFMG.

**Tabela 1 – Iniciadores de Oligonucleotídeos selecionados para PCRrt.**

| Iniciadores       | Sequência de nucleotídeos (nt)          | Tamanho | Fragmento Amplificado |
|-------------------|-----------------------------------------|---------|-----------------------|
| <b>HSACVR1For</b> | 5'- CTG CCT TCG AAT AGT GCT GTC CAT -3' | 24 nt   | 100 pb                |
| <b>HSACVR1Rev</b> | 5'- TAA ATC TCG ATG GGC AAT GGC TGG -3' | 24 nt   |                       |
| <b>HSBMP4For</b>  | 5'- CAG GAG ATG GTA GTA GAG GGA TGT-3'  | 24 nt   | 140pb                 |
| <b>HSBMP4Rev</b>  | 5'- AGT CTG TGT AGT GTG TGG GTG A -3'   | 22 nt   |                       |
| <b>HSs26For</b>   | 5'- TGT GCT TCC CAA GCT GTA TGT GAA -3' | 24 nt   | 75pb                  |
| <b>HSs26Rev</b>   | 5'- CGA TTC CTG ACT ACT TTG CTG TG -3'  | 23 nt   |                       |

#### 4.4.3 Transcrição reversa (RT)

A RT para síntese de sscDNA (DNA complementar de fita simples) foi realizada a partir de 700 ng de RNA total em volume final de reação de 21 μL por amostra. Resumidamente, 700 ng de RNA foram pre-incubados a 70°C por 10 minutos com 10 pmol de cada primer reverso, específico para os genes alvos em estudo, juntamente com 10 pmol de primer oligo dT<sub>18</sub> (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 11 μl do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 μL de dNTP mix (10 mM de cada) foram incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e primers previamente descrita. A

reação foi finalizada a 4°C e imediatamente utilizada na PCRtr. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

#### 4.4.4 PCR em tempo real (PCRtr)

As amostras de sscDNA resultantes da RT foram utilizadas na PCRtr. A PCRtr foi realizada no equipamento PRISM® 7500/ABI Sequence Detection System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras em triplicata, foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de reação de 25 µL cada. Alíquotas de 2 µL de sscDNA das amostras foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se posteriormente, 23 µL de sybr Mix (12.5 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,15 µL de cada primer (senso e anti-senso; 10 pmol/ul) e água estéril filtrada (q.s.p. 25 µl). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15 s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60°C para análise da especificidade dos *amplicons*.

#### 4.5 Análise estatística:

Para a quantificação relativa foi realizada uma análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes alvo com o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo, onde o controle endógeno será utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos (média do CT gene alvo – média do CT controle endógeno) gerando o  $\Delta CT$ . Utilizando-se o  $\Delta CT$  será calculado o  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta CT$  amostra –  $\Delta CT$  do calibrador (amostra de referência)). Ao final foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  chegando-se aos níveis relativos de expressão (*fold change in gene expression*) de cada gene alvo.

Os resultados foram lançados no programa *GraphPad Prism* 5, para a análise estatística, onde se utilizou o Test t de student não pareado e ANOVA (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Os resultados foram estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados do estudo e seleção oligonucleotídeos iniciadores para síntese de dsRNA das regiões mutada e normal do gene *ACVR1* para ensaios de RNAi em modelo PBMC.

Os primers de oligonucleotídeos desenhados para os siRNA das regiões mutadas e normal do gene *ACVR1*, para os estudos de expressão por PCRtr, são apresentados abaixo na **Tabela 2**. As sequências foram pesquisadas no Blast, para obtenção de oligonucleotídeos iniciadores sense e anti-sense de acordo com protocolo do Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion® by life technologies™, 2012) todos os primers desenhados com 21 nucleotídeos. Na **Tabela 3** pode-se verificar as quantificações obtidas para cada primer desenhado, mostrando sua pureza.

**Tabela 2 - Oligonucleotídeos desenhados para os dsRNA das regiões mutadas e normal do gene *ACVR1***

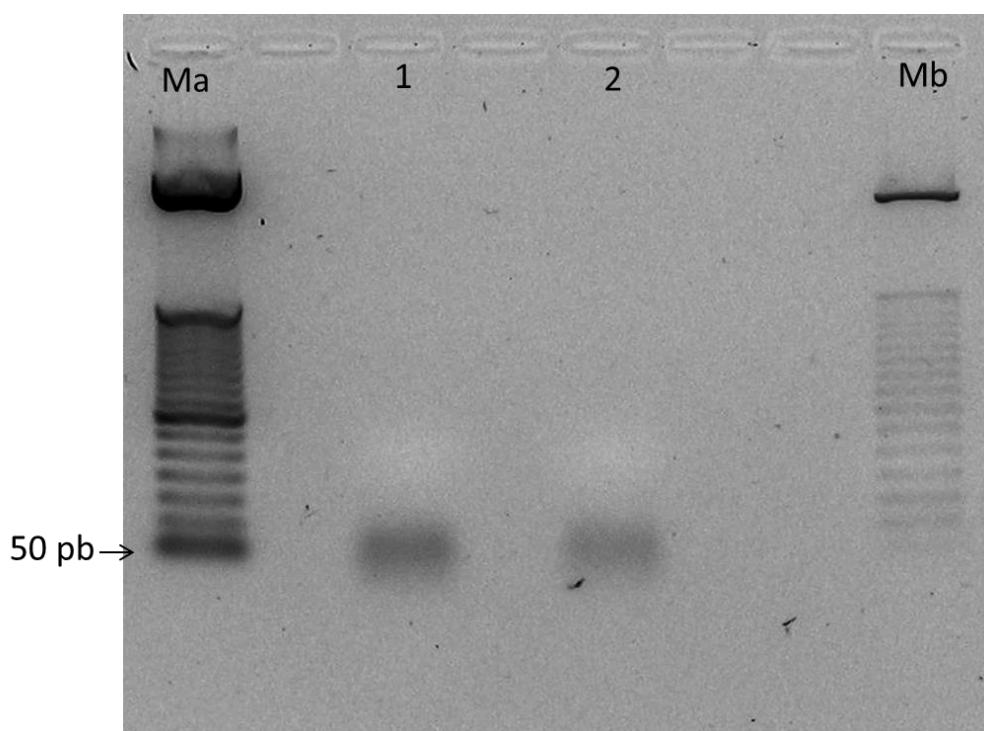
|                         | Sequencia                   |
|-------------------------|-----------------------------|
| ACVR1 senso             | 5' AACAGTGGCTCGCCAGATTAC 3' |
| ACVR1 anti-senso        | 5' AAGTAATCTGGCGAGCCACTG 3' |
| ACVR1 mutado senso      | 5' AACAGTGGCTCACCAGATTAC 3' |
| ACVR1 mutado anti-senso | 5' AAGTAATCTGGTGAGCCACTG 3' |

**Tabela 3 - Quantificações de cada primer desenhado**

| Primer      | Comprimento de onda |       |         | Concentração<br>[ ] ug/uL |
|-------------|---------------------|-------|---------|---------------------------|
|             | 260                 | 280   | 260/280 |                           |
| RNAiFOPFOR  | 94.15               | 52.69 | 1.786   | 3108                      |
| RNAiFOPREV  | 94.65               | 52.35 | 1.813   | 3113                      |
| RNAiFOPMFOR | 91.36               | 49.52 | 1.847   | 3011                      |
| RNAiFOPMREV | 34.87               | 28.85 | 1.269   | 938.2                     |

## 5.2 Resultado do controle positivo do siRNA duplex:

Na **Figura 6** observa-se que os fragmentos dos siRNAs duplexes do ACVR1 (R206H) e ACVR1 normal foram sintetizados adequadamente e estão no tamanho correspondente ao previsto, conforme protocolo do Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion® by life technologies™, 2012).

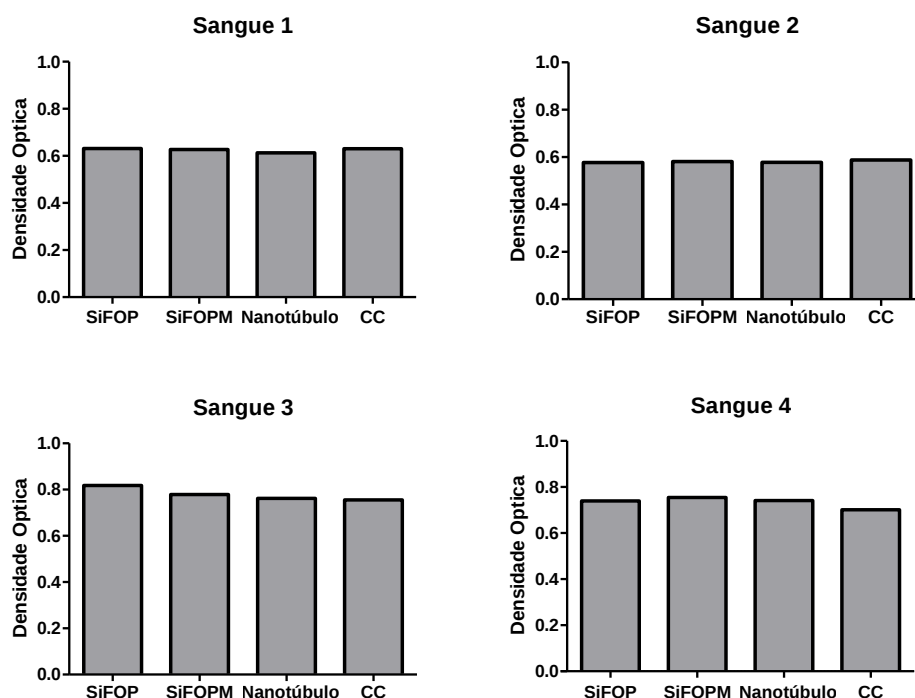


**Figura 6-** Fragmentos de siRNA dupla-fita, de 21 pb, sintetizados para silenciamento dos mRNAs de ACVR1 normal (**1**) e mutado (**2**), visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 2% após coloração com brometo de etídio. (**M**) Marcador de 50 pb DNA ladder (**a** = 1 ug e **b** = 0,5 ug).

## 5.3 Resultados da viabilidade celular no modelo *in vitro* de PBMC de pacientes com FOP e indivíduos controles através de cultivo primário para transfecção de siRNA em nanopartículas de carbono (NPC).

Os resultados obtidos pelo método da resazurina mostram que não há diferença na densidade optica obtida das células tratadas e controle, mostrando que o tratamento não alterou a viabilidade celular. A contagem das células com azul de tripan também confirmou que o tratamento das células não alterou a viabilidade celular. Os resultados obtidos corroboram com os

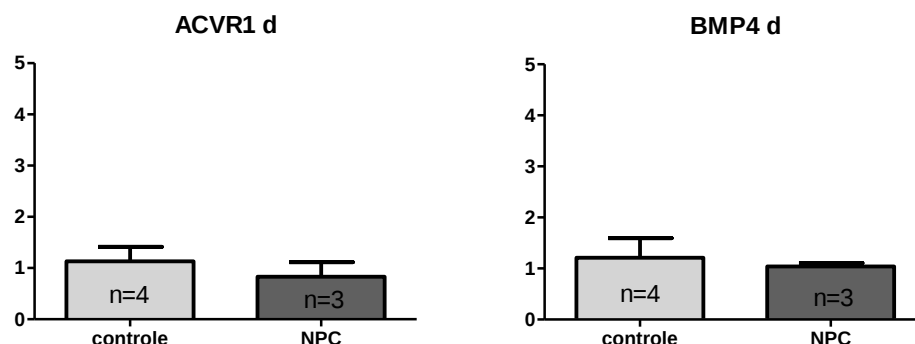
resultados de viabilidade celular descritos na literatura (O'BRIEN *et al*, 2000). O que pode ser visto na **Figura 7**.



**Figura 7** – Resultado da viabilidade celular dos siRNA em NPC

**5.4 Resultados da expressão dos genes alvos, ACVR1 e BMP4, em PBMC de indivíduos controles normais e PBMC de indivíduos com FOP em seu estado basal e quando submetidas à nanopartícula de carbono (NPC).**

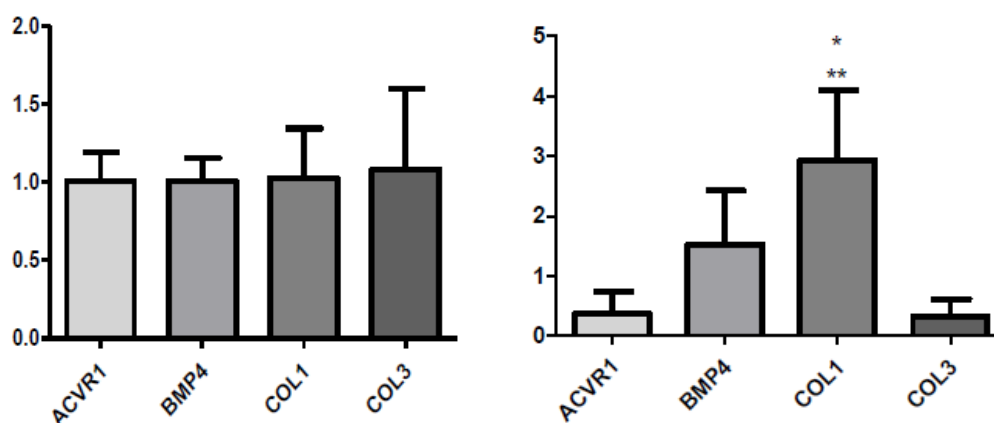
Os resultados dos níveis de expressão dos genes alvos ACVR1 e BMP4 em PBMC de indivíduos controles normais em seu estado basal e quando submetidos ao veículo de transfecção NPC, demonstraram que a NPC não alterou a expressão de ACVR1 e BMP4 (**Figura 8**).



**Figura 8** – Comparação dos níveis de expressão do mRNA de ACVR1 e BMP4 no controle normal sem e com o veículo de transfecção nanopartícula de carbono.

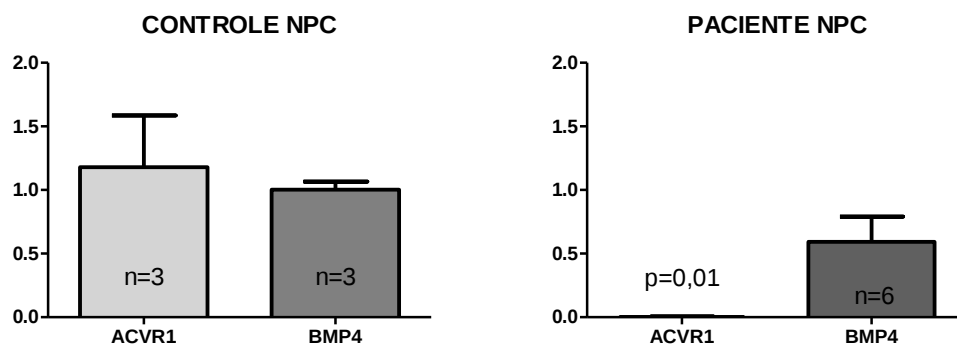
Portanto o primeiro resultado deste trabalho demonstra que a NPC não altera a expressão dos principais genes envolvidos na fisiopatologia da FOP, sendo assim poderá ser usada como veículo de transfecção de siRNA em células de cultivo celular. Este modelo é útil para estudos dos efeitos do siRNA sobre a expressão gênica em células de indivíduos controles e em células de pacientes portadores de Fibrodiasplasia Ossificante Progressiva, auxiliando no entendimento das vias de expressão gênica, através da expressão dos transcritos determinada por quantificação absoluta ou relativa, por PCR em tempo real.

Os níveis de expressão dos genes alvos (ACVR1 e BMP4) em células indivíduos controles normais e células de pacientes com FOP demonstram que nas células de pacientes saudáveis há um equilíbrio na expressão dos genes alvos, e nas células de pacientes com FOP, há uma expressão diminuída de ACVR1 e super-expressão de BMP4. Este perfil já foi bem definido em trabalhos prévios e confirmados em um trabalho recente feito pelo nosso grupo de pesquisa – **(Figura 9)** (Dissertação de Mestrado. Nascimento, D.R. 2014).



**Figura 9 – Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos no controle e em células de FOP.** A – Comparação de expressão entre os genes alvos no controle em seu estado basal. B – Comparação de expressão entre os genes alvos no paciente em seu estado basal. (Dissertação de Mestrado. Nascimento, D.R. 2014)

O resultado dos níveis de expressão dos genes alvos ACVR1 e BMP4, no controle e em células de FOP, ambos em seu estado basal, quando submetidos ao veículo de transfecção NPC, demonstrou que a NPC não alterou a expressão de ACVR1 e BMP4. No controle com NPC há uma equilíbrio na expressão desses genes, e, em células de FOP o perfil de subexpressão de ACVR1 e superexpressão de BMP4 também é evidenciado na presença da NPC (**Figura 10**). Portanto a NPC não alterou a expressão dos genes alvos, o estado basal permaneceu mantido como descrito por Nascimento, D.R. 2014, o que torna viável o uso do NPC como veículo de transfecção em células PBMC para estudo da FOP.



**Figura 10** – Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos no controle e em células de FOP com o veículo de transfecção nanopartícula de carbono. **A** – Comparação de expressão entre os genes alvos no controle com NPC em seu estado basal. **B** – Comparação de expressão entre os genes alvos no paciente com NPC em seu estado basal.

Ativação anormal de formação óssea endocondral em tecidos moles causa doenças médicas significativas associadas à incapacidade e dor. Mutações hiperativas no receptor tipo 1, ACVR1, levam a fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP), caracterizada por ossificação progressiva em tecidos moles. Os mecanismos celulares específicos da FOP não são claros, além disso, as dificuldades na obtenção de amostras de tecido de pacientes com FOP e as limitações em modelo animal para FOP, dificultam a capacidade de detalhamento da patogênese da FOP (MATSUMOTO *et al.*, 2013).

Para enfrentar esses desafios e desenvolver modelos da doença *in vitro*, células-tronco humanas pluripotentes induzidas, derivadas de fibroblastos normais e de FOP dérmicas, tem sido criadas por métodos distintos, por exemplo, integração retroviral ou vetores episomais sem integração, no intuito de se contribuir no entendimento das diferentes etapas da formação óssea endocondral na FOP (MATSUMOTO *et al.*, 2013).

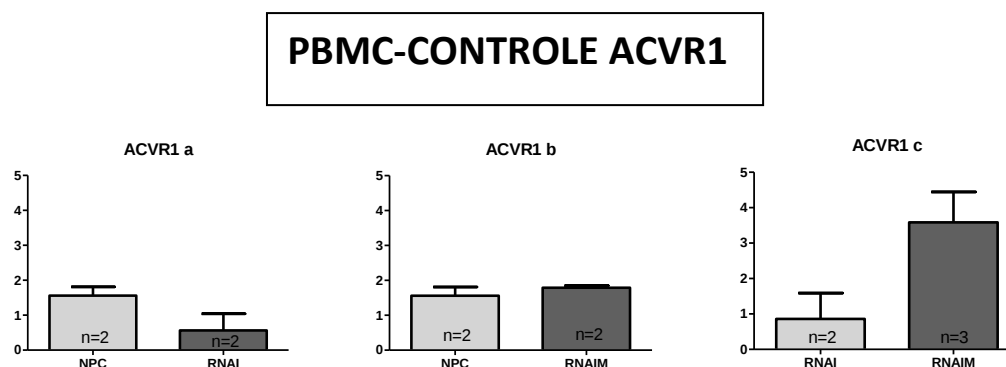
Entretanto entende-se que pela complexidade dos mecanismos envolvidos *in vivo*, há uma emergente necessidade de se estabelecer modelos mais simples para o estudo destas vias em condições basais e com um mínimo possível de variáveis fisiopatológicas, mantendo a fisiologia celular íntegra num

ambiente controlável. Por esta razão nosso trabalho teve como meta principal realizar a interferência por RNAi utilizando nanopartículas de carbono para a transfecção do siRNA, através de modelo *in vitro* de PBMC que é extremamente simples.

Este trabalho é pioneiro no que se refere a incorporação de NPC em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com FOP. Este modelo experimental mostrou-se muito útil para estudo, pois a nanopartícula de carbono não interferiu na expressão dos genes alvos da FOP.

### **5.5 Resultados da expressão dos mRNAs de ACVR1 em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.**

Os resultados obtidos da expressão de ACVR1 em PBMC de indivíduos controles após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado e carregadas por NPC estão na **Figura 11**, e demonstram que quando o silenciamento é realizado pelo siRNA do alelo normal não há diferença significativa ( $p=0,2$ ), mas há tendência a subexpressão no controle que recebeu o tratamento (**Figura 11-A**). No entanto quando o silenciamento é realizado com o RNAi do alelo mutado (ACVR1 (R206H)) claramente não ocorre silenciamento (**Figura 11-B**). A **Figura 11-C**, mostra que o controle tratado com siRNA para ACVR1 mutado apresenta tendência a estar aumentado em relação ao tratado com siRNA para ACVR1 normal apesar de não ser significativa ( $p=0,1$ ). Porém a tendência apresentada no gráfico (A) pode ser real (ou seja talvez tenha havido algum silenciamento não sendo possível mostrar por causa do  $n$  baixo). Esperávamos de fato que houvesse algum silenciamento quando usado o RNAi normal uma vez que este grupo é o grupo controle.



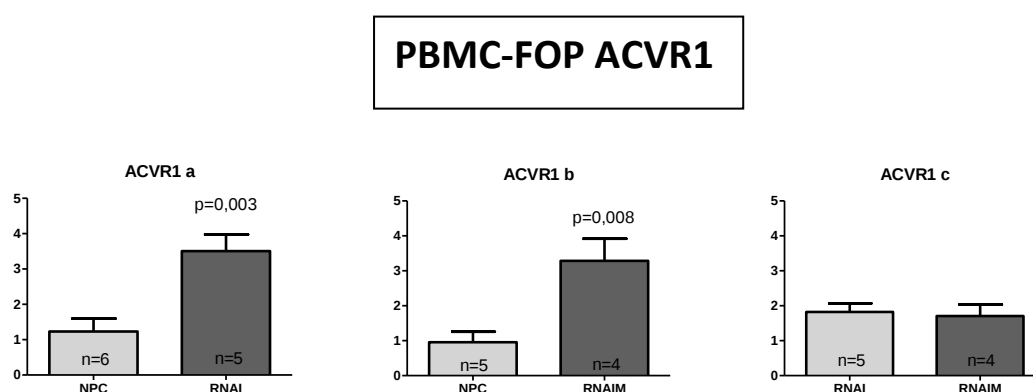
**Figura 11** –Expressão dos mRNAs de ACVR1 em PBMC de indivíduos controles normais após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC. **A** – controle com NPC e controle com siRNA para ACVR1 normal. **B** – controle com NPC e controle com siRNA mutado. **C**- controles silenciados com siRNA de ACVR normal e siRNA de ACVR1 mutado.

Os resultados obtidos da expressão de ACVR1 em PBMC de indivíduos com FOP após transfecção com moléculas de RNAi para ACVR1 não mutado e carregadas por NPC estão na **Figura 12**, e demonstram que há superexpressão de ACVR1 independente de qual siRNA foi utilizado para o silenciamento. Ou seja, houve um aumento significativo da expressão do ACVR1 quando o silenciamento foi realizado pelo siRNA do alelo normal (**Figura 12-A**), e também quando o silenciamento foi realizado com o siRNA do alelo mutado (ACVR1 (R206H)) (**Figura 12-B**). A **Figura 12-C**, mostra claramente que a expressão gênica ficou equiparada, portanto o gene não silenciado se expressou mais, isto é quando o silenciamento é realizado com o siRNA normal o alelo mutado se expressa mais e quando o silenciamento é realizado com o siRNA mutado o alelo normal se expressa mais. Isso sugere que deve haver um mecanismo de regulação gênica entre os alelos. No entanto quando ocorre a inibição do alelo alterado o alelo não mutado se expressa e chega próximo a expressão basal do alelo normal. É preciso estudar o quanto isto modifica a fisiopatologia desta doença. Mas será necessário fazer um estudo posterior a este para sabermos com certeza qual ACVR1 está superexpresso.

Em um trabalho onde foram utilizados siRNA alelo-específicos, capaz de suprimir especificamente a expressão do alelo mutante em células progenitoras mesenquimais de pacientes com FOP, foi observado que houve a diminuição da sinalização de BMP (KAPLAN *et al*,2012). Configurando que o

silenciamento por RNAi tem um potencial efeito terapêutico para o tratamento da FOP.

Mas o quanto muda a expressão da BMP4? Se isto altera a fisiopatologia das crises? São perguntas que demandarão estudos posteriores.

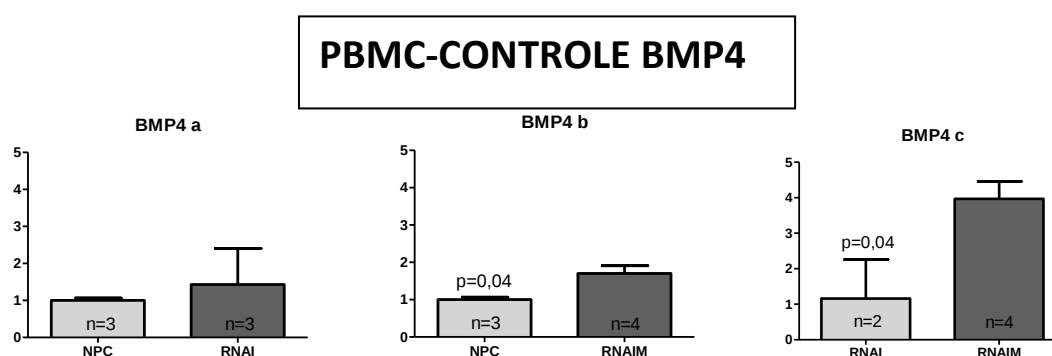


**Figura 12 – Expressão dos mRNAs de ACVR1 em PBMC de indivíduos com FOP após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.** A – paciente com NPC e paciente com siRNA para ACVR normal. O tratamento com siRNA para o ACVR normal aumentou a expressão do ACVR1 nos pacientes. B – paciente com NPC e paciente com siRNA mutado. O tratamento com siRNA para o ACVR1 mutado aumentou a expressão do ACVR1 nos pacientes. C- pacientes silenciados com siRNA de ACVR1 normal e siRNA de ACVR1 mutado. Não há diferença entre a expressão do ACVR1 quando tratado com siRNA para o ACVR1 normal e o mutado.

## 5.6 Resultados da expressão dos mRNAs de BMP4 em PBMC de indivíduos controles normais e de portadores de FOP após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.

A expressão de BMP4 em células PBMC controles normais após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado não tiveram aumento, no entanto, após transferência com moléculas de siRNA para ACVR1

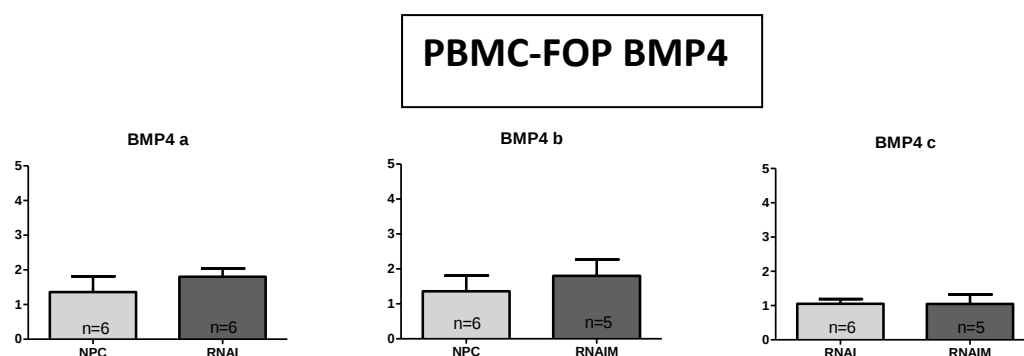
(R206H), houve uma superexpressão da BMP4 (**Figura 13**). Por alguma razão este siRNA mutado conseguiu alterar a expressão de BMP4 sem alterar a expressão do ACVR1.



**Figura 13 –Expressão dos mRNAs de BMP4 em PBMC de indivíduos controles normais após transfecção com moléculas de siRNA para ACVR1 (R206H) e com moléculas de siRNA para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.** A – controle com NPC e controle com siRNA para ACVR normal. Não houve diferença na expressão de BMP4 entre o controle e o controle tratado com siRNA para ACVR normal. B – controle com NPC e controle com siRNA mutado. Houve superexpressão de BMP4 no controle tratado com siRNA para ACVR mutado. C- controles silenciados com siRNA de ACVR normal e siRNA de ACVR1 mutado. Há superexpressão de BMP4 no controle tratado com siRNA para ACVR mutado comprovando os dados dos gráficos a e b.

A expressão de BMP4 em células PBMC de pacientes após transfecção com moléculas de RNAi para ACVR1 não mutado e RNAi para ACVR1 (R206H) não tiveram aumento significativo, no entanto há uma tendência de aumento da BMP4 quando as células foram tratadas com siRNA (**Figura 14**). Por este estudo, no entanto, mesmo que tenhamos conseguido suprimir o ACVR parece que não modificamos a expressão da BMP4, isto será porque o

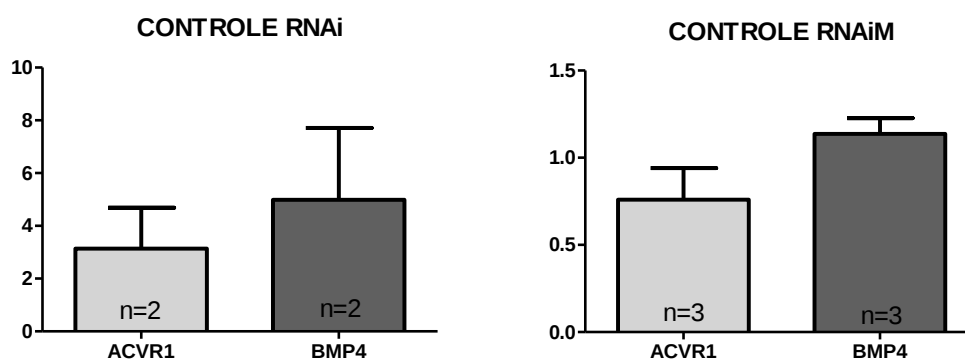
ACVR superexpresso interfere na expressão de BMP4? Se isto acontece realmente, por qual via seria?



**Figura 14 –Expressão dos mRNAs de BMP4 em PBMC de indivíduos com FOP após transfecção com moléculas de RNAi para ACVR1 (R206H) e com moléculas de RNAi para ACVR1 não mutado, carregadas por NPC.** A – paciente com NPC e paciente com RNAi para ACVR normal. Não há diferença na expressão de BMP4 entre o paciente controle e o paciente tratado com siRNA para ACVR normal. B – paciente com NPC e paciente com RNAi mutado. Não há diferença na expressão de BMP4 entre o paciente controle e o tratado com siRNA para ACVR mutado. C- pacientes silenciados com RNAi de ACVR normal e RNAi de ACVR1 mutado. Não há diferença na expressão de BMP4 entre o tratamento com siRNA para ACVR normal ou mutado.

Na **Figura 15** compara-se a expressão dos genes em células controles quando a interferência foi realizada com o siRNA para ACVR não mutado e com o siRNA para ACVR (R206H) (mutado). Observamos que quando a interferência é pelo siRNA para ACVR não mutado, temos uma tendência ao silenciamento do ACVR mas sem mudança significativa da BMP4, apesar de menor tendência ao aumento da mesma. Não sabemos se essa tendência seria significativa se a amostra fosse maior ou necessitaria de um silenciamento maior para ativar a cascata e aumentar significativamente a BMP4. No entanto, a surpresa é quando fazemos a interferência com o siRNA

para ACVR (R206H) (mutado), e observamos uma superexpressão de BMP4 de forma significativa. Será que este siRNA para ACVR (R206H) modificou este meio e ativou a via da BMP4 que por esta razão aumentou. Como ocorre essa sinalização? Sabemos que essa sinalização é extremamente complexa e inúmeros fatores funcionam como gatilho, mas pouco sabemos como é o comportamento celular a nível molecular quando ocorre este gatilho. No entanto certamente está envolvendo mais a BMP4 que o próprio ACVR1.



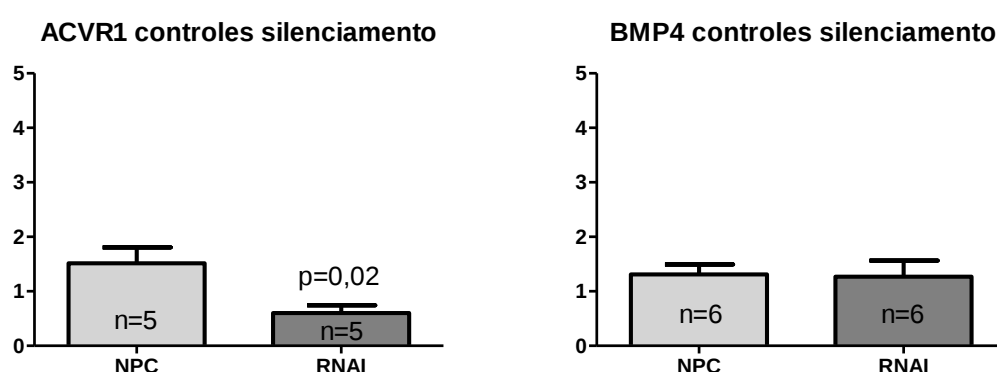
**Figura 15. Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos nas células controle**

Na **Figura 16** mostra-se a comparação da expressão dos genes em células de pacientes com FOP quando a interferência foi realizada com siRNA para ACVR não mutado e com o siRNA para ACVR (R206H) (mutado). Observamos que há uma superexpressão de ACVR1 independente do siRNA utilizado, e não há aumento significativo da BMP4 embora pareça ter um discreto aumento, no entanto mesmo não havendo diferença na expressão de BMP4, quando utilizamos um ou outro siRNA, observamos que há um equilíbrio entre BMP4 e ACVR1. Isso significa que há uma modulação na expressão gênica quando usamos o siRNA. Mas este equilíbrio seria suficiente para manter o paciente sem crises agudas?



**Figura 16. Comparação dos níveis de expressão dos genes alvos células do paciente**

Foi repetido o experimento para avaliar a expressão de ACVR1 em PBMC de indivíduos controles após transfecção com moléculas de siRNA para *ACVR1* não mutado e carregadas por NPC, numa amostra maior. Quando foi realizado na amostra menor (**Figura 11**), demonstrou-se que o silenciamento realizado pelo siRNA do alelo normal não teve diferença significativa ( $p=0,2$ ), mas há tendência a subexpressão. Por esta razão repetiu-se em uma amostra maior e observou-se inibição de 60% do ACVR1 no controle, com diferença significativa ( $p<0,02$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17. Reavaliação do silenciamento em genes alvos de controles evidenciando inibição de 60% do ACVR1 do controle.**

## 6. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho concluímos que:

Os procedimentos experimentais envolvendo os siRNAs e os NTCs não interferiram na viabilidade das células.

A nanopartícula de carbono por si só não produziu nenhuma alteração significativa em todos os experimentos.

Portanto neste trabalho ficou evidente que o estudos moleculares de silenciamento gênico utilizando o modelo de PBMC e nanopartículas de carbono, é viável. Como é um modelo relativamente simples permitirá futuros estudos na compreensão da fisiopatologia da FOP.

O siRNA para o alelo normal silenciou 60% da expressão de mRNA para ACVR1 em PBMC controle.

O siRNA mutado não alterou a expressão de mRNA para ACVR1 em PBMC controle

Os siRNAs mostram-se específicos

Tanto o siRNA normal quanto o mutado aumentam a expressão de ACVR1 em PBMC de FOP

Interessantemente a RNAi utilizando-se o siRNA mutado, produziu na PBMC controle um efeito semelhante aquele observado no estado basal de FOP, isto é, um aumento da expressão do BMP4

### Perspectivas

O somatório destes resultados demonstram que o presente modelo em PBMC poderá ser importante nos futuros estudos envolvendo os mecanismos moleculares de regulação da expressão dos principais genes da FOP, através de microRNAs.

Os dados aqui apresentam pela primeira vez um modelo celular, em que se vê o efeito do microRNA causando a alteração mais fundamental descrita na fisiopatologia da FOP (aumento de BMP4), que leva à cascata molecular para a ossificação heterotópica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, S.; KATAGIRI, T.; NAMIKI, M.; YAMAJI, N.; YAMAMOTO, N.; MIYAMA, K.; SHIBUYA, H.; UENO, N.; WOZNEY, J. M.; SUDA, T. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Experimental Cell Research*, v. 235, n. 2, p. 362-369, 1997.
- ALMEIDA, L. S. Análise molecular do gene CRTAP através da técnica de PCR-SSCP-sequenciamento em pacientes com Osteogênese Imperfeita do Espírito Santo. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- ALLENDORPH, G. P., ISAACS, M. J., KAWAKAMI, Y., BELMONTE, J. C. I., CHOE, S. BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* v. 46, p.12238-12247, 2007.
- AMES, C. P.; NOTTMEIER, E. W.; DICKMAN, C. A.; SONNTAG, V. K. H. Target Tissue Engineering in Spinal Surgery. The Bone Morphogenetic Proteins: Past, Present and Future. *Barrow Quaterly*. v. 19, n. 1, 2003.
- ANDRIOPOULOS, B., JR., CORRADINI, E., XIA, Y., FAASSE, S. A., CHEN, S., GRGUREVIC, L., KNUTSON, M. D., PIETRANGELO, A., VUKICEVIC, S., LIN, H. Y., BABITT, J. L. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature Genet.* V.41, p. 482-487, 2009.
- ARAUJO, P. A. O. R. A. Análise de expressão do gene Igi1 durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e seu silenciamento utilizando a técnica de interferência por RNA. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas. 2008.
- BAULCOMBE D. Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol Suppl* v.15, p.189-201,1999.
- BOWERS, R. R., KIM, J. W., OTTO, T. C., LANE, M. D. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 103, p.13022-13027, 2006.
- BOCCIARDI R., BORDO D., DI D.M., DI R.M., RAVAZZOLO R. Mutational analysis of the ACVR1 gene in Italian patients affected with fibrodysplasia ossificans progressiva: confirmations and advancements. *Eur J Hum Genet* v.17, p. 311–318,2009.
- BOCCIARDI, R.; RAVAZZOLO, R. Is there a biological basis for treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva with rosiglitazone? Potential benefits and undesired effects. *PPAR Research*, article ID 541927, 2010.

CARVALHO, D. R.; NAVARRO, M. M. M.; MARTINS, B. J. A. F.; COELHO, K. E. F. A.; MELLO, W. D.; TAKATA, R. I. SPECK-MARTINS CE. Mutational screening of ACVR1 gene in Brazilian fibrodysplasia ossificans progressiva patients. *Clinical Genetics*, v. 77, p. 171-176, 2010.

CEJALVO, T., SACEDON, R., HERNANDEZ-LOPEZ, C., DIEZ, B., GUTIERREZ-FRIAS, C., VALENCIA, J., ZAPATA, A. G., VARAS, A., VICENTE, A. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology*. v 121,p. 94-104, 2007.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. v. 22, n. 4, p. 233-241, 2004.

CHENG, H., JIANG, W., PHILLIPS, F. M., HAYDON, R. C., PENG, Y., ZHOU, L., LUU, H. H., AN, N., BREYER, B., VANICHAKARN, P., SZATKOWSKI, J. P., PARK, J. Y., HE, T.-C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. V.85-A*, p. 1544-1552, 2003.

CHEN Y-G., LIU F., MASSAGUE J. Mechanism of TGF- $\beta$  receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* v.16, p.3866–76, 1997.

DAVID, L., MALLET, C., MAZERBOURG, S., FEIGE, J.-J., BAILLY, S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. V. 109, p. 1953-1961, 2007.

DALUISKI, A., ENGSTRAND, T., BAHAMONDE, M. E., GAMER, L. W., AGIUS, E., STEVENSON, S. L., COX, K., ROSEN, V., LYONS, K. M. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature Genet.* v.27, p. 84-88, 2001.

DELAI, P. L. R.; KANTANIE, S.; SANTILI, C.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia ossificante progressiva: uma doença hereditária de interesse multidisciplinar. *Revista Brasileira de Ortopedia*. v. 39, n. 5, p. 205-2013, 2004.

DERYNCK R, AKHURST RJ. Differentiation plasticity regulated by the TGF- $\beta$  family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9:1000–4, 2007.

DILEONE, R. J., KING, J. A., STORM, E. E., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., KINGSLEY, D. M. The Bmp8 gene is expressed in developing skeletal tissue and maps near the achondroplasia locus on mouse chromosome 4. *Genomics* v.40, p. 196-198, 1997.

DRAZ, M. S.; FANG, B. A.; ZHANG, P.; HU, Z.; GU, S.; WENG, K. C.; GRAY, J. W.; CHEN, F. F. Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for

Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics* V. 4, n. 9, p. 872-892, 2014.

EPSTEIN, C. J., ERICKSON, R. P., WYNshaw-BORIS, A. Inborn Errors of Development: The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis. Oxford University Press. 2004.

FIORI, J. L.; BILLINGS, P. C.; SERRANO DE LA PENA, L.; KAPLAN, F. S.; SHORE, E. M. Dysregulation of the BMP-p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 21, p. 902-909, 2006.

FISHMAN MC, PORTER JA. A new grammar for drug discovery. *Nature* v.437, p.491–493, 2005.

FRANCESCHI, R. T.; IYER, B. S.; CUI, Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 9, n. 6, p. 843-854, 1994, on line 2009.

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V. Colágeno: uma abordagem para estética. *RIES*. v. 2, n. 2, p. 49-61, 2013.

FUKUDA, T.; KOHDA, M.; KANOMATA, K.; NOJIMA, J.; NAKAMURA, A.; KAMIZONO, J.; NOGUCHI, Y.; IWAKIRI, K.; KONDO, T.; KUROSE, J.; ENDO, K.; AWAKURA, T.; FUKUSHI, J.; NAKASHIMA, Y.; CHIYONOBU, T.; KAWARA, A.; NISHIDA, Y.; WADA, I.; AKITA, M.; KOMORI, T.; NAKAYAMA, K.; NANBA, A.; MARUKI, Y.; YODA, T.; TOMODA, H.; YU, P. B.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S.; MIYAZONO, K.; MATSUOKA, M.; IKEBUCHI, K.; OHTAKE, A.; ODA, H.; JIMI, E.; OWAN, I.; OKAZAKI, Y.; KATAGIRI, T. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 11, p. 7149-7156, 2009.

FURUYA, H.; IKEZOE, K.; WANG, L.; OHYAGI, H.; MOTOMURA, K.; FUJI, N.; KIRA, J.; FUKUMAKI, Y. A unique case of fibrodysplasia ossificans progressiva with an ACVR1 mutation, G356D, other than the common mutation (R206H). *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 4, p. 459-463, 2008.

GATTI D, VIAPIANA O, ROSSINI M, SILVANO A. Rosiglitazone therapy is associated with major clinical improvements in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res*. V.25(6), p.1460-1462, 2010.

GAZZERRO E., CANALIS E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord*. V. 7, p 51–65, 2006.

GAZZINELLI, G.; KATZ, N.; ROCHA, R. S.; COLLEY, D. G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen- induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *Journal of Immunology*, v. 130, n. 6, p. 2891-2895, 1983.

GROPPE, J.; GREENWALD, J.; WIATER, E.; RODRIGUEZ-LEON, J.; ECONOMIDES, A. N.; KWIATKOWSKI, W.; AFFOLTER, M.; VALE, W. W.; BELMONTE, J. C. I.; CHOE, S. Structural basis of BMP signaling inhibition by custine knot protein Noggin. *Nature*. v. 420, p. 636-642, 2002.

GROPPE, J.C.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 462, p. 87-92, 2007.

HANG, C. T., YANG, J., HAN, P., CHENG, H.-L., SHANG, C., ASHLEY, E., ZHOU, B., CHANG, C.-P. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* v.466, p. 62-67, 2010.

HARAMIS, A.-P. G., BEGTHEL, H., VAN DEN BORN, M., VAN ES, J., JONKHEER, S., OFFERHAUS, G. J. A., CLEVERS, H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* v.303, p. 1684-1686, 2004.

Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.102(16), p.5820-5825, 2005.

HARRADINE K.A., AKHURST R.J. Mutations of TGF- $\beta$  signaling molecules in human disease. *Ann Med*. v.38, p.403–414, 2006.

Hartung A, Sieber C, Knaus P. Yin and Yang in BMP signaling: impact on the pathology of diseases and potential for tissue regeneration. *Signal Transduct* v.6, p.314–328,2006.

HEBELA N, SHORE E.M., KAPLAN F.S. Three pairs of monozygotic twins with fibrodysplasia ossificans progressiva: the role of environment in the progression of heterotopic ossification. *Clin Rev Bone Miner Metab* v.3, p.205–208, 2005.

HUSE M, CHEN Y-G, MASSAGUE J, KURIYAN J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF- $\beta$ -receptor in complex with FKBP12. *Cell* v.96, p.425–436, 1999.

HUSE M, MUIR TW, XU L, CHEN YG, KURIYAN J, MASSAGUE J. The TGF- $\beta$  receptor activation process: an inhibitor-to-substrate binding switch. *Mol Cell*. V.8, p.671–682, 2001.

IDE, H., KATOH, M., SASAKI, H., YOSHIDA, T., AOKI, K., NAWA, Y., OSADA, Y., SUGIMURA, T., TERADA, M. Cloning of human bone morphogenetic protein type 1B receptor (BMPR-1B) and its expression in prostate cancer in comparison with other BMPRs. *Oncogene*. v.14, p.1377-1382, 1997.

Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*. v.127, p.1755–1766, 1994.

Kan L, Liu Y, McGuire TL, Berger DMP, Atwatramani RB, Dymecki SM, et al. Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification. *Stem Cells*. V.27, p.150–156, 2009.

Kaplan F.S., Glaser D.L., Shore E.M., Pignolo R.J., Xu M, Zhang Y, et al. Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am*. v.89,p.347–57, 2007.

KAPLAN, F. S.; LEMERRER, M.; GLASER, D. L.; PIGNOLO, R. J.; GOLDSBY, R. E.; KITTERMAN, J. A.; GROPE, J.; SHOREM E. M. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, v. 22, n. 1, p. 191-205, 2008 a.

KAPLAN, F. S.; SHEN Q.; LOUNEV, V.; SEEMANN, P.; GROPE, J.; KATAGIRI, T.; PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M. Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, v. 26, p. 521-30, 2008 b.

KAPLAN, F. S.; SHORE, E. M.; GUPTA, R.; BILLINGS, P. C.; GLASER, D. L.; PIGNOLO, R. J.; GRAF, D.; KAMOUN, M. Immunological Features of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva and the Dysregulated BMP4 Pathway. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. v. 3, n. 3-4, p. 189-193, 2005.

KAPLAN, F. S.; TABAS, J. A.; ZASLOFF, M. A. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a clue from the fly *Calcif Tissue*, v. 47, p. 117-125, 1990.

KAPLAN, F.S.; PIGNOLO, R.J.; SHORE, E. M. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v. 20, n. 5-6, p. 399-407, 2009a.

Kaplan FS, Xu M, Seemann P et al. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Hum Mutat*. v.30, p.379–390, 2009b.

KAPLAN, J.; KAPLAN, F.S.; SHORE, E.M. Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor

cells by mutant allele-specific targeting. *Gene Ther.* v.19, n.7, p. 786–790, 2012.

KETTING R.F., HAVERKAMP T.H., VAN LUENEN H.G., PLASTERK R.H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell.* v.99, n.2, p.133-141, 1999.

KUIVANIEMI, H., TROMP, G., PROCKOP, D. J. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Human Mutation.* v. 9, n. 4, p. 300-315, 1997.

LACERDA, L. L. Expressão Gênica de Células do Microambiente Tímico: modificações fenotípicas e funcionais após a inativação do gene CD49e por interferência de RNA. [Tese de Doutorado] . Instituto Oswaldo Cruz. 2008.

LADEIRA, M. S.; ANDRADE, V. A.; GOMES, E. R. M.; AGUIAR, C. J.; MORAES, E. R.; SOARES, J. S.; SILVA, E. E.; LACERDA, R. G.; LADEIRA, L. O.; JORIO, A.; LIMA, P.; LEITE, M. F.; RESENDE, R. R.; GUATIMOSIM, S. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology.* v.21, p. 385101- 385113, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods,* v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIN G.T., CHANG H.W., LIU C.S., HUANG P.J., WANG H.C., CHENG Y.M. De novo 617G-A nucleotide mutation in the ACVR1 gene in a Taiwanese patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Hum Genet.* v. 51, p. 1083–1086, 2006.

LOPEZ-COVIELLA, I., BERSE, B., KRAUSS, R., THIES, R. S., BLUSZTAJN, J. K. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science.* v.289, p. 313-316, 2000.

Lounev V.Y., Ramachandran R, Wosczyzna M.N., Yamamoto M, Maidment A.D.A., Shore E.M., et al. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* v.91, p.652–63, 2009.

LUYTEN, F. P., CUNNINGHAM, N. S., MA, S., MUTHUKUMARAN, N., HAMMONDS, R. G., NEVINS, W. B., WOOD, W. I., REDDI, A. H. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J. Biol. Chem.* v.264, p.13377-13380, 1989.

MAGALHÃES T., BRACKNEY DE, BEIER J.C., FOY B.D. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito

mortality after a blood meal. *Arch Insect Biochem Physiol.* v. 68, n. 3, p.134-143, 2008.

MASSAGUE J., SEOANE J., WOTTON D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* v.19, p. 2783–2810, 2005.

MATSUMOTO, Y.; HAYASHI, Y.; SCHLIEVE, C. R.; MAKOTO, I.; KIM, H.; NGUYEN, T. D.; SAMI, S.; BABA, S.; BARUET, E.; NASU, Q.; ASAKA, I.; OTSUKA, T.; YAMANAKA, S.; CNCLIN, B. R.; TOGUCHIDA, J.; HSIAO, E. C. Induced pluripotent stem cells from patients whit human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* v. 8, n. 190, 2013.

MOHMMED A., DASARADHI P.V., BHATNAGAR R.K., CHAUHAN V.S., MALHOTRA P. In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei*--a mouse malaria model. *Biochem Biophys Res Commun.* v.309, n. 3, p.506-511, 2003.

NAKAJIMA M., HAGA N., TAKIKAWA K., MANABE N., NISHIMURA G., IKEGAWA S. The ACVR1 617G>A mutation is also recurrent in three Japanese patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Hum Genet.* v. 52, p. 473–475, 2007.

NEUHAUS, H., ROSEN, V., THIES, R. S. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* v. 80, p. 181-184, 1999.

OLMSTED-DAVIS, E; GANNON, F. H; OZEN, M; ITTMANN, M. M.; GUGALA, Z.; HIPPI, J. A.; MORAN, K. M.; FOULETIER-DILING, C. M.; SCHUMARA-MARTIN, S.; LINDSEY, R. W.; HEGGENESS, M. H.; BRENNER, M. K.; DAVIS, A. R.; Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. *American Journal of Pathology.* v. 170, n. 2, p. 620-632, 2007.

OZKAYNAK, E., SCHNEGELSBERG, P. N. J., JIN, D. F., CLIFFORD, G. M., WARREN, F. D., DRIER, E. A., OPPERMAN, H. Osteogenic protein-2: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed in early embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 25220-25227, 1992.

PALHARES, D. B. Myositis Ossificans Progressive. *Calcified Tissue International.* v. 60, p. 394, 1997.

PALHARES, D. B.; LEME, L. M. Miosite ossificante progressiva: uma perspectiva no controle da doença. *Jornal de Pediatria.* v. 77, n. 5, p. 431-434, 2001.

PALHARES, D. B.; LEME, L. M.; NAKA, E. N.; MELNIKOV, P. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Oral Ascorbate and Intravenous Biphosphonate during Flare-Ups. *Journal of Musculoskeletal Pain.* v. 18, n. 3, p. 270-276, 2010.

PAULA, M. Biomateriais injetáveis de colágeno bovino para correções plásticas em geral. Household and Cosméticos. 2007.

PEREIRA, T. C. Estudos das possíveis aplicações médicas da Interferência por RNA. Orientador Iscia Lopes. Tese de Doutorado. Campinas 2005.

PEREIRA T.C., PASCOAL V.D., MARCHESINI R.B., MAIA I.G., MAGALHÃES L.A., ZANOTTI-MAGALHÃES E.M., LOPES-CENDES I. Schistosoma mansoni: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol.* v.118, n. 4, p.619-623, 2008.

PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Fybrodysplasia Ossificans Progressiva: Clinical and Genetic Aspects. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* v. 620, 2011.

PLIKUS, M. V., MAYER, J. A., DE LA CRUZ, D., BAKER, R. E., MAINI, P. K., MAXSON, R., CHUONG, C.-M. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature.* v. 451, p. 340-344, 2008.

ROELEN B.A., TEN DIJKE P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFb family members. *J Orthop Sci.* v.8, p.740–748, 2003.

ROSEN, V., WOZNEY, J. M., WANG, E. A., CORDES, P., CELESTE, A., MCQUAID, D., KURTZBERG, L. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPS and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect. Tissue Res.* v.20, p. 313-319, 1989.

ROSENSTIRN, J. A. A contribution to the study of myositis ossificans progressiva. *Annals of Surgery.* v. 68, p. 485-520. 591-637. 1918.

SHEN, Q.; LITTLE, S. C.; XU, M.; HAUPT, J.; AST, C.; KATAGIRI, T.; MUNDLOS, S.; SEEMANN, P.; KAPLAN, F. S.; MULLINS, M. C.; SHORE, E. M. The fibrodysplasia ossificans progressive R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *Journal of Clinical Investigation.* v. 119, n. 11, p. 3462-3472, 2009.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell.* v. 113, p. 685-700, 2003.

SHORE, E. M.; FELDMAN, G.; XU, M.; KAPLAN, F. S. The genetics of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism.* v. 3, p. 201-204, 2005.

SHORE, E. M.; XU, M.; FELDMAN, G. J.; FENSTERMACHER, D. A.; CHO, T.; CHOI, I. H.; CONNOR, J. M.; DELAI, P.; GLASER, D. L.; LEMERRER, M.; MORHART, R.; ROGERS, J. G.; SMITH, R.; TRIFFITT, J. T.; URTIZBEREA, J. A.; ZASLOFF, M.; BROWN, M. A.; KAPLAN, F.S. A recurrent mutation in the

BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nature Genetics*. v. 38, n. 5, p. 525–527, 2006.

Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion® by life technologies™), 2012.

SOARES, A. F. Avaliação da expressão da BMP-2/4 e BMPR-1A em Carcinoma Epidermóide Oral metastático e não metastático. Tese (Doutorado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

SONG, G.; KIM, H.; WOO, K.; BAEK, J.; KIM, G.; CHOI, J.; RYOO, H. Molecular consequences of ACVR1 R206H mutation of fibrodysplasia ossificans progressiva. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 285, n. 29, p. 22542–22553, 2010.

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. v.99, n. 2, p.123-32, 1999.

TAKAHASHI, M.; KATAGIRI, T.; FURUYA, H.; HOHJOH, H. Disease-causing allele-specific silencing against the ALK2 mutants, R206H and G356D, in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Gene Ther*. v.19, n. 7, p.781-785, 2012.

TANG, Q.-Q., OTTO, T. C., LANE, M. D. Commitment of CH3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Nat. Acad. Sci*. v.101, p. 9607-9611, 2004.

TEN DIJKE, P., ICHIJO, H., FRANZEN, P., SCHULZ, P., SARAS, J., TOYOSHIMA, H., HELDIN, C.-H., MIYAZONO, K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*. v.8, p. 2879-2887, 1993.

TOMPKINS S.M., LO C.Y., TUMPEY T.M., EPSTEIN S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.101, n. 23, p.8682-8686, 2004.

TSENG, Y.-H., KOKKOTOU, E., SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., WINNAY, J. N., TANIGUCHI, C. M., TRAN, T. T., SUZUKI, R., ESPINOZA, D. O., YAMAMOTO, Y., AHRENS, M. J., DUDLEY, A. T., NORRIS, A. W., KULKARNI, R. N., KAHN, C. R. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. v.454, p. 1000-1004, 2008. (Note: Erratum: *Nature* 459: 122 only, 2009.)

UMULIS, D.; O`CONNOR, M. B.; BLAIR, S. S. The extracelular regulation of boné morphogenetic protein signalin. *Development*. v. 136, p. 3715-3728, 2009.

UPRICHARD S.L., BOYD B., ALTHAGE A., CHISARI F.V. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.102, n. 3, p.773-778, 2005.

VAN DINTHER M., VISSER N., DE GORTER D.J., DOORN J., GOUMANS M.J., DE BOER J., TEN DIJKE P. ALK2 R206H mutation linked to fibrodysplasia ossificans progressiva confers constitutive activity to the BMP type I receptor and sensitizes mesenchymal cells to BMP-induced osteoblast differentiation and bone formation. *J Bone Miner Res.* v.25, n. 6, p.1208-1215, 2010.

VINCENT, S.; MARTY, L.; FORT, P. S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. *Nucleic Acids Research.* v. 21, n. 6, 1993.

VUKICEVIC S., LUYTEN F.P., REDDI A.H. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.86, p.8793–8797, 1989.

WANG, H.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S; GROPE, J.; PIGNOLO, R. J. Hypoxia promotes ligand-independent activation of the ACVR1 (R206H) mutant receptor in C2C12 cells. *Journal of Bone and Mineral Research.* v. 23, p. 433, 2008.

Wang T, Li B-Y, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, et al. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF- $\beta$  family type I receptors. *Cell* v. 86, p.435–44, 1996.

WAGNER T.U. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells—one signal many consequences. *FEBS J.* v. 274, p.2968–2976, 2007.

XIA X., ZHOU H., HUANG Y., XU Z. Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis.* v.23, n.3, p. 578-86, 2006.

YAMAGUCHI T., KURISAKI A., YAMAKAWA N., MINAKUCHI K., SUGINO H. FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7–Smurf1 complex on activin type I receptor. *J Mol Endocrinol.* v.36, p. 569–579, 2006.

YOON B.S., OVCHINNIKOV D.A., YOSHII I., MISHINA Y., BEHRINGER R.R., LYONS K.M. BMPR1A and BMPR1B have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.102, n.14, p.5062–5067, 2005.

YOON B.S., LYONS K.M. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem.* v. 93, n.1, p.93–103, 2004.

YU, P. B.; DENG, D. Y.; LAI, C. S.; HONG, C. C.; CUNY, G. D.; BOUXSEIN, M. L.; HONG, D. W.; MCMANUS, P. M.; KATAGIRI, T.; SACHIDANANDAN, C.; KAMIYA, N.; FUKUDA, T.; MISHINA, Y.; PETERSON, R. T.; BLOCH, K. D. BMP type I receptor inhibition prevents ectopic ossification in mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Nature Medicine*. v. 14, n. 12, p. 1363-1369, 2008.

Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. v. 4, p. 33–41, 2008.

ZHANG D., SCHWARZ E.M., ROSIER R.N., ZUSCIK M.J., PUZAS J.E., O'KEEFE R.J. ALK2 functions as a BMP type I receptor and induces Indian Hedgehog in chondrocytes during skeletal development. *J Bone Miner Res*. v. 18, p.1593–604, 2003.

## ANEXOS

### Anexo I

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para os pais)

Nome do voluntário\*: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G. \_\_\_\_\_

Responsável legal\*: \_\_\_\_\_ R.G. Responsável legal: \_\_\_\_\_

O(A) Seu filho sendo convidado(a) a participar deste projeto de pesquisa: **“Silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H) pela técnica de interferência por RNA, em cultura de células linfoblastoides de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário ”. Pesquisador- Orientador Responsável Local e Instituição a que pertence: Liane de Rosso Giuliani / Almir de Sousa Martins (Pós Graduação da UFMS) cujo telefone para contato é (67) 33453372. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações você poderá contactar diretamente o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado na UFMS/ Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Cidade Universitária, CEP: 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil, Telefone (67) 33457187.**

A participação de seu filho nesta pesquisa será doando cerca de 10ml de sangue. Seu filho não correrá nenhum risco apenas o desconforto da coleta de sangue ou o surgimento de algum hematoma no local. Este material será utilizado exclusivamente para a realização da pesquisa que fará uma cultura das células em laboratório, e a partir desta cultura será avaliada a expressão de genes envolvidos com a doença antes e depois da interferência por RNA, através de técnicas de biologia molecular. O objetivo dessa pesquisa é aumentar a compreensão das características da doença que ainda são pouco conhecidas, na tentativa de identificar algum caminho para onde serão concentrados os esforços para o tratamento da doença. Ao final da pesquisa, todos estes resultados serão entregues em cópia para o(a) Sr(a), de uma forma clara e simples, e poderão ser discutidos nas consultas de aconselhamento genético que serão realizadas com vocês sem custos. Neste momento estaremos explicando cada resultado e o impacto que isto poderá ter no seguimento clínico de seu filho. Os dados individuais, resultados de exames e testes bem como o prontuário serão mantidos em sigilo (segredo), sendo divulgados apenas para fins de pesquisa, sem nomear (identificar) seu filho, ou identifica-lo por características particulares.

Os novos conhecimentos derivados deste estudo deverão ser publicados para poder beneficiar outros pacientes afetados com FOP como seu filho. Você tem total liberdade de recusar participar deste trabalho (agora ou a qualquer momento durante o mesmo) e isto não afetará o seu atendimento.

Qualquer dúvida que o(a) Sr(a). tenha sobre esta pesquisa ou sobre o tratamento de seu (sua) filho(a), estaremos à disposição nos locais onde serão feitos os atendimentos.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_  
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_,  
responsável legal por \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Anexo II

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para adultos)

Nome do voluntário\*: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos

R.G. \_\_\_\_\_

O(A) Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar deste projeto de pesquisa **“Silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H) pela técnica de interferência por RNA, em cultura de células linfoblastoides de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário ”. Pesquisador- Orientador Responsável Local e Instituição a que pertence: Liane de Rosso Giuliani / Almir de Sousa Martins (Pós Graduação da UFMS) cujo telefone para contato é (67) 33453372. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações você poderá contactar diretamente o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado na UFMS/ Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Cidade Universitária, CEP: 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil, Telefone (67) 33457187.**

A sua participação nesta pesquisa será doando cerca de 10ml de sangue. Você não correrá nenhum risco apenas o desconforto da coleta de sangue ou o surgimento de algum hematoma no local. Este material será utilizado exclusivamente para a realização da pesquisa que fará uma cultura das células em laboratório, e a partir desta cultura será avaliada a expressão de genes envolvidos com a doença antes e depois da interferência por RNA, através de técnicas de biologia molecular. O objetivo dessa pesquisa é aumentar a compreensão das características da doença que ainda são pouco conhecidas, na tentativa de identificar algum caminho para onde serão concentrados os esforços para o tratamento da doença. Ao final da pesquisa, todos estes resultados serão entregues em cópia para o(a) Sr(a), de uma forma clara e simples, e poderão ser discutidos nas consultas de aconselhamento genético que serão realizadas com vocês sem custos. Neste momento estaremos explicando cada resultado e o impacto que isto poderá ter no seu seguimento clínico. Os dados individuais, resultados de exames e testes bem como o prontuário serão mantidos em sigilo (segredo), sendo divulgados apenas para fins de pesquisa, sem nomear (identificar)-lo, ou identifica-lo por características particulares.

Os novos conhecimentos derivados deste estudo deverão ser publicados para poder beneficiar outros pacientes afetados com FOP. Você tem total liberdade de recusar participar deste trabalho (agora ou a qualquer momento durante o mesmo) e isto não afetará o seu atendimento.

Qualquer dúvida que o(a) Sr(a). tenha sobre esta pesquisa ou sobre o seu tratamento, estaremos à disposição nos locais onde serão feitos os atendimentos.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_  
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Anexo III

**Termo de Assentimento Livre e Esclarecido**

Nome do voluntário\*: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G. \_\_\_\_\_

Responsável legal\*: \_\_\_\_\_

R.G. Responsável legal: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado(a) a participar deste projeto de pesquisa **“Silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H) pela técnica de interferência por RNA, em cultura de células linfoblastoides de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário ”. Pesquisador- Orientador Responsável Local e Instituição a que pertence: Liane de Rosso Giuliani / Almir de Sousa Martins (Pós Graduação da UFMS) cujo telefone para contato é (67) 33453372. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações você poderá contactar diretamente o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado na UFMS/ Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Cidade Universitária, CEP: 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil, Telefone (67) 33457187A .**

A sua participação nesta pesquisa será doando cerca de 10ml de sangue. Você não correrá nenhum risco apenas o desconforto da coleta de sangue ou o surgimento de algum hematoma no local. Este material será utilizado exclusivamente para a realização da pesquisa que fará uma cultura das células em laboratório, e a partir desta cultura será avaliada a expressão de genes envolvidos com a doença antes e depois da interferência por RNA, através de técnicas de biologia molecular. O objetivo dessa pesquisa é aumentar a compreensão das características da doença que ainda são pouco conhecidas, na tentativa de identificar algum caminho para onde serão concentrados os esforços para o tratamento da doença. Ao final da pesquisa, todos estes resultados serão entregues em cópia para você de uma forma clara e simples, e poderão ser discutidos nas consultas de aconselhamento genético que serão realizadas com vocês sem custos. Neste momento estaremos explicando cada resultado e o impacto que isto poderá ter no seu seguimento clínico. Os dados individuais, resultados de exames e testes bem como o prontuário serão mantidos em sigilo (segredo), sendo divulgados apenas para fins de pesquisa, sem nomear (identificar)-lo, ou identifica-lo por características particulares.

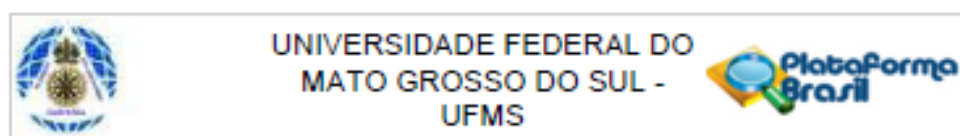
Os novos conhecimentos derivados deste estudo deverão ser publicados para poder beneficiar outros pacientes afetados com FOP. Você tem total liberdade de recusar participar deste trabalho (agora ou a qualquer momento durante o mesmo) e isto não afetará o seu atendimento.

Qualquer dúvida que voce tenha sobre esta pesquisa ou sobre o seu tratamento, estaremos à disposição nos locais onde serão feitos os atendimentos.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_  
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Anexo IV



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H) pela técnica de Interferência por RNA, em cultura de células linfoblastóides de pacientes com Fibrodysplasia Ossificante Progressiva obtidas por cultivo primário

**Pesquisador:** LIANE DE ROSSO GIULIANI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 35177914.3.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 814.800

**Data da Relatoria:** 30/09/2014

## Apresentação do Projeto:

A FOP é uma doença genética autossômica dominante complexa, caracterizada por malformações esqueléticas congênitas e ossificação heterotópica progressiva induzida por processo inflamatório (3). Com prevalência estimada de cerca de 1: 2 milhões, é descrita em todo o mundo, a forma clássica apresentam uma mutação em heterozigose (c.617G>A, p.R206H) no gene do receptor da ativina 1 (ACVR1) também conhecido como gene do receptor kinase  $\zeta$ like da ativina 2 (ALK2), localizado no cromossomo 2q23-24. O receptor ACVR1 (ALK2) é um dos receptores Tipo I das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A fisiopatologia da FOP tem sido um grande desafio dos últimos anos, envolve a desregulação da via de sinalização das BMPs, interação desta com várias vias metabólicas e ativação do sistema imunológico. Aplicações da Técnica de Interferência por RNA (RNAi) na genômica funcional e tratamento de doenças Humanas vem sendo usado como uma ferramenta poderosa para análise sistemática da função gênica. Na FOP, esta técnica será utilizada como uma ferramenta de investigação da fisiopatologia. A estratégia de Inibir o ACVR1 (R206H) por RNAi, que está sendo cogitada por alguns pesquisadores, representa um grande desafio e é muito promissora (3). E na nossa opinião, esta é a forma mais efetiva de abordagem terapêutica desta doença. O Objetivo deste projeto é determinar um modelo experimental para o silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 014.000

em cultura de células infoblastoides de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Determinação de um modelo experimental para o silenciamento da expressão gênica do ACVR1 (R206H) em cultura de células infoblastoides de pacientes com FOP obtidas por cultivo primário.

**Objetivo Secundário:**

1. Desenvolver a cultura de células infoblastoides de pacientes com FOP através de cultivo primário.
2. Desenvolver PCR em tempo real para caracterizar as células infoblastoides cultivadas de pacientes com FOP, através do estudo da expressão de ACVR1(R206H), ACVR1, BMP4, Prócolagênio tipo III, ACVR2.
3. Realizar a caracterização da genômica funcional das células imortalizadas dos pacientes com FOP.
4. Silenciar a expressão de ACVR1 (R206H) de infoblastos de pacientes com FOP através da técnica de RNAi.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Para os pacientes doadores de amostra de sangue periférico: desconforto da punção venosa. Benefícios:

A compreensão da fisiopatologia aumenta a perspectiva de terapias principalmente para o controle das crises agudas que resultam em calcificações.

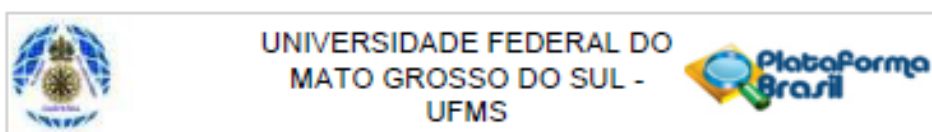
Aos participantes da pesquisa e seus responsáveis será exposto o resultado da pesquisa e todo o direcionamento referente a possíveis mudanças no manejo da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa altamente relevante na área da genética experimental em células de pacientes portadores de distúrbio genético. Protocolo classificado como área temática especial devendo estar adequado à Resolução 340/2004. Assim foram buscados no protocolo:

- a) justificativa da pesquisa; (PRESENTE)
- b) como os genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos em estudo se relacionam com eventual condição do sujeito da pesquisa; (PRESENTE)
- c) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados e indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou de produtos gênicos que serão estudados; (ADEQUADO APÓS DILIGÊNCIA)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



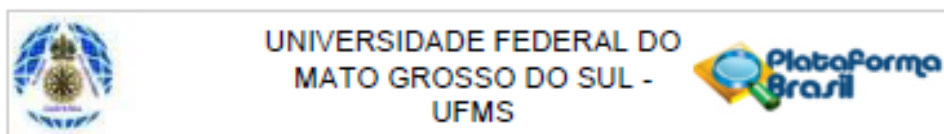
Continuação do Parecer: 014.000

- d) justificativa para a escolha e tamanho da amostra, particularmente quando se tratar de população ou grupo vulnerável e de culturas diferenciadas (ADEQUADO);
- e) formas de recrutamento dos sujeitos da pesquisa e de controles, quando for o caso (PRESENTE)
- f) análise criteriosa dos riscos e benefícios atuais e potenciais para o indivíduo, o grupo e gerações futuras, quando couber; (ADEQUADO APÓS DILIGÊNCIA)
- g) informações quanto ao uso, armazenamento ou outros destinos do material biológico; (SERÃO DESCARTADOS)
- h) medidas e cuidados para assegurar a privacidade e evitar qualquer tipo ou situação de estigmatização e discriminação do sujeito da pesquisa, da família e do grupo; (PRESENTE)
- i) explicitação de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas e quanto à propriedade industrial, quando couber; (NÃO PROCEDE)
- j) descrição do plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, quando indicado, incluindo nomes e contatos dos profissionais responsáveis, tipo de abordagens de acordo com situações esperadas, consequências para os sujeitos e condutas previstas. Os profissionais responsáveis pelo aconselhamento genético e acompanhamento clínico deverão ter a formação profissional e as habilitações exigidas pelos conselhos profissionais e sociedades de especialidade; (NÃO PROCEDE POIS NÃO SERÃO REALIZADOS NOVOS DIAGNÓSTICOS MAS, A ASSISTÊNCIA JÁ PRESTADA SERÁ MANTIDA)
- l) justificativa de envio do material biológico e/ou dados obtidos para outras instituições, nacionais ou no exterior, com indicação clara do tipo de material e/ou dados, bem como a relação dos exames e testes a serem realizados. Esclarecer as razões pelas quais os exames ou testes não podem ser realizados no Brasil, quando for o caso; (NÃO PROCEDE)
- m) em projetos cooperativos internacionais, descrição das oportunidades de transferência de tecnologia. (NÃO PROCEDE)
- Ainda verificamos que o cronograma e o orçamento são compatíveis com os objetivos. Há colaboração de outra instituição de pesquisa nacional.
- Não foram detectados conflitos de interesse.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O Termo de assentimento está presente e foi readequado pois não era claro sobre os procedimentos nem adequado a menores de idade com pouca compreensão sobre a doença. O autor elaborou ainda um TCLE aos pais e responsáveis com as possíveis explicações, conforme exigido pela resolução 340/2004. As autorizações institucionais estão apensadas ao protocolo, .

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 014.000

**Recomendações:**

Que o protocolo seja submetido à CONEP para apreciação final.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Ante ao exposto, e por ter atendido às nossas solicitações de adequação à Resolução 466/2012 e 340/2004, somos de parecer favorável à sua aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CAMPO GRANDE, 01 de Outubro de 2014

---

Assinado por:  
Edilson dos Reis  
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bloesica@propp.ufms.br