INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

ESTUDO DOS EFEITOS ENDÓCRINOS E PARÁCRINOS DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM MODELOS ANIMAIS DE TERAPIA GÊNICA

ELIZA HIGUTI

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

Orientadora:
Dra. Cibele Nunes Peroni

SÃO PAULO
2011

Dedico este trabalho

Aos meus pais Kenzo Higuti e Rosa Higuti, meus exemplos de luta e determinação, por todo apoio e esforço que fazem diariamente para que eu continue na busca dos meus objetivos, sempre respeitando as minhas escolhas e vibrando a cada conquista.

Aos meus irmãos Marcos K. Higuti e Claudio T. Higuti, por toda amizade, carinho e muitas vezes, compreensão.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Júlia e João Kenzo, meus grandes amores e verdadeiros tesouros da minha vida.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Cibele Nunes Peroni, por toda oportunidade, confiança, incentivo, paciência, respeito e por ser uma das principais responsáveis pelo amadurecimento da minha vida profissional, pessoal e acadêmica.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Claudia, Nélio e Renata, por toda ajuda, amizade, conselhos, conversas e brincadeiras durante estes anos.

Aos amigos Dra. Maria Teresa, Dr. Carlos, Juliana, Beatriz, Geyza, Fernanda, Miriam, Giseli, Marcos, Roberto, Junqueira, Johnny, José Maria, Natália, Laura, Neide, Rute e Arlete, por toda ajuda e pelos bons momentos compartilhados.

À Edna, Néia, Sandra, Bete e Gislene, pelos vários lanches fora de hora, pelos diversos momentos agradáveis e descontraídos.

À Kátia, Andréa, Cynthia, Camilla, Juçara, Keyde, Keli, Christianne, Daniela, Lilian, Fernanda, Valmir, Conceição, Sandra, Edson, Josefa, Maria, Cybelle, Esmeralda, Carolina, e Fábio, por toda amizade e por serem meus grandes companheiros para todas as horas.

Ao Jonatha, por todo amor, carinho e incentivo na realização dos meus objetivos.

À todos os colegas do Centro de Biotecnologia do IPEN, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

"Tire o chapéu para o passado, e arregace as mangas para o futuro! Tire de cada dificuldade que a vida lhe trouxer a lição de que nada tem valor a não ser o que é conquistado."

(Autor desconhecido)

ESTUDO DOS EFEITOS ENDÓCRINOS E PARÁCRINOS DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM MODELOS ANIMAIS DE TERAPIA GÊNICA

ELIZA HIGUTI

RESUMO

Nosso grupo tem estudado uma estratégia alternativa de tratamento para a deficiência de hormônio de crescimento (DGH), utilizando a administração *in vivo* do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, no músculo quadríceps de camundongos anões e imunodeficientes (*lit/scid*), que proporcionou níveis sustentáveis de hGH na circulação durante 60 dias e um aumento significativo de peso dos animais tratados. Visando investigar os efeitos autócrinos/parácrinos e endócrinos derivados deste tipo de tratamento, e compará-los aos da administração diária por via parenteral do hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH) neste modelo animal, os seguintes parâmetros de crescimento foram avaliados no presente trabalho: peso corpóreo, comprimento total do corpo e da cauda, pesos de órgãos (fígado, rins, coração, baço, músculos quadríceps e gastrocnêmio) e os níveis plasmáticos de mIGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I de camundongo) e de glicose. Em um primeiro experimento, foram observados aumentos altamente significativos (P<0,001) do peso corpóreo e do comprimento total do corpo e da cauda, após 50 dias de tratamento. Todos os órgãos analisados para o grupo tratado, exceto os músculos gastrocnêmios apresentaram aumentos de peso altamente significativos. O quadríceps direito, o que recebeu a injeção do DNA plasmidial, apresentou um aumento de peso de 48,1% em comparação com o controle injetado com salina (P<0,001), enquanto o aumento de peso dos quadríceps esquerdo, não injetados, dos animais tratados foi de 31% (P<0,005). Estes dados sugerem efeitos locais (autócrino e / ou parácrinos) e sistêmicos (endócrinos) resultantes da injeção do plasmídeo contendo o gene do hGH e da consequente expressão e secreção do hGH. Em outro experimento, a comparação da administração única de DNA plasmidial com injeções diárias de r-hGH proporcionou aumentos significativos dos pesos corpóreos, em relação ao grupo

controle, de 23,1% (P<0,01) e de 35,5% (P<0,001) para os grupos tratados com DNA e proteína, respectivamente, enquanto as inclinações das curvas de crescimento foram praticamente idênticas: 0,094 g / animal / dia para a injeção de DNA e 0,095 g / animal / dia para a proteína. Entre os dois grupos tratados, não houve diferenças significativas entre o peso dos seguintes órgãos: rins direito e esquerdo, baço e músculo quadríceps direito. Os níveis de glicose no plasma dos grupos tratados e controle não apresentaram diferenças significativas ao final dos tratamentos de 28 e 50 dias. As diferenças das concentrações de mIGF-I entre os grupos tratados foram significativas apenas após 7 dias de tratamento. Os valores foram sempre maiores para o grupo tratado com DNA plasmidial em relação ao grupo do r-hGH, e os níveis de ambos os grupos tratados foram significativamente superiores ao do grupo controle.

Apesar da necessidade de outros estudos para confirmar a segurança e a viabilidade deste tratamento, este tipo de terapia gênica para a DGH pode vir a ser uma alternativa viável ao tratamento padrão desta doença, baseado em repetidas injeções de r-hGH altamente purificado.

STUDY OF ENDOCRINE AND PARACRINE EFFECTS OF GROWTH HORMONE AFTER ADMINISTRATION OF PLASMID DNA IN ANIMAL MODELS OF GENE THERAPY

ELIZA HIGUTI

ABSTRACT

Our group has studied an alternative strategy for the treatment of growth hormone deficiency (GHD), using the *in vivo* administration of the plasmid pUC-UBI-hGH, followed by electroporation, into the quadriceps muscle of immunodeficient dwarf mice (lit/scid), that provided sustainable levels of hGH in the circulation during 60 days and a significant increase of body weight in the treated animals. In order to investigate the autocrine / paracrine and endocrine effects derived from this type of treatment, and compare them to the parentheral daily administration of the recombinant human growth hormone (r-hGH) in this animal model, the following growth parameters were evaluated in this study: body weight, total body length, tail length, organ weights (liver, kidneys, heart, spleen, quadriceps and gastrocnemius muscles) and the plasmatic levels of mIGF-I (mouse insulin-like growth factor I) and glucose. In a first experiment, higly significant increases of body weight, total body length and tail length were observed, after 50 days of treatment. All the analised organs of the treated group, except the two gastrocnemius muscles, presented a highly significant weight increase. The right quadriceps, that received the DNA injection, presented a 48.1% weight increase versus saline – injected control ($P<0.001$), whereas the weight increase of left quadriceps, non injected, of treated animals was 31.0% ($P<0.005$). These data suggest local (autocrine and / or paracrine) and systemic (endocrine effects as a result of hGH DNA injection and the consequent hGH expression and secretion. In a second experiment, the comparison between single plasmid DNA administration with daily r-hGH injections provided significant body weight increases ($P<0.001$) of both treated groups, compared to control group, of 23.1% ($P<0.01$) and 35.5% for DNA and protein treated groups respectively, while the slopes of the growth curves were practically identical: 0.094 g / mouse / day for DNA and 0.095 g / mouse / day for protein injection. In both treated groups, the

weights of the following organs did not present significant differences: right and left kidneys, spleen and right quadriceps muscle. The levels of glucose in the plasma of treated and control groups showed no significant differences after 28 and 50 days. The differences in mIGF-I concentration, among the treated groups, were significant only 7 days after treatment. The values were always higher in the group treated with plasmid DNA in relation to the r-hGH group, and the levels of both treated groups were significantly higher than the control group.

Despite the need for further studies to confirm the safety and feasibility of this treatment, this type of gene therapy for DGH can be a viable alternative to the standard treatment for this disease, based on repetitive injections of highly purified r-hGH.

Sumário

Página

1. INTRODUÇÃO..... 01
2. OBJETIVOS 08
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 09
3.1 MATERIAL..... 09
3.1.1 Equipamentos e acessórios principais..... 09
3.1.2 Principais reagentes para biologia molecular..... 10
3.1.3 Materiais utilizados na administração de DNA plasmidial seguida de eletroporação..... 10
3.1.3.1 Plasmídeo utilizado..... 11
3.1.3.2 Animais utilizados..... 11
3.1.4 Material utilizado na administração de r-hGH..... 12
3.1.5 Principal reagente utilizado na dosagem de glicose..... 12
3.1.6 Principal reagente utilizado na dosagem de mIGF-I..... 12
3.2 MÉTODOS..... 12
3.2.1 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH..... 12
3.2.2 Pré-ensaios..... 13
3.2.3 Administração *in vivo* do DNA plasmidial seguida de eletroporação 13
3.2.4 Administração diária de hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH)..... 13
3.2.5 Realização de medidas de comprimento e obtenção de sangue e órgãos..... 14
3.2.6 Dosagem de glicose..... 14
3.2.7 Dosagem de mIGF-I..... 15
3.2.8 Cálculo da porcentagem de crescimento máximo obtido..... 15
3.2.9 Análise estatística 15
4. RESULTADOS..... 16
4.1 Avaliação do crescimento de camundongos *lit/scid,* após a injeção direta de DNA plasmidial ou salina, seguida de eletroporação..... 16
4.2 Comparação entre o crescimento obtido após a administração direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, ou após injeções de hGH recombinante..... 23

4.3 Dosagem de glicose no plasma de camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, juntamente com eletroporação, ou com r-hGH e de camundongos imunodeficientes (*Scid)*..... 28

4.4 Determinação das concentrações plasmáticas de mIGF-I em camundongos *Scid* e em camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, juntamente com eletroporação, ou com injeções de r-hGH 29

5. DISCUSSÃO..... 31

6. CONCLUSÕES..... 39

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 40

1. INTRODUÇÃO

O hormônio de crescimento (GH – *growth hormone*) é um hormônio protéico de cadeia única, composto por 191 aminoácidos, sintetizado e secretado pelas células somatotróficas da hipófise anterior. Suas principais isoformas possuem peso molecular de 20 e 22 kilodaltons (kDa) (Melmed & Kleinberg, 2002; Salvatori, 2004; Portes & Barbosa, 2008).

A secreção do GH apresenta padrão pulsátil, com maior freqüência e amplitude após o início do sono profundo, é regulada por uma complexa inter-relação entre dois peptídeos hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH (GHRH) e a somatostatina (SRIF). Estes dois hormônios são secretados em vias independentes e interagem com os secretagogos adicionais do GH, gerando uma liberação pulsátil desse hormônio. O GHRH induz a tradução do gene do GH e a sua liberação (Figura 1). A somatostatina inibe tanto o GH basal como o estimulado pelo GHRH mediante alterações na frequência e amplitude dos pulsos, porém sem afetar sua biosíntese. Além destes, outros fatores interferem na secreção do GH, atuando diretamente sobre a hipófise ou sobre a liberação destes fatores hipotalâmicos, tais como neurotransmissores (noradrenalina, serotonina, dopamina, acetilcolina), hormônios periféricos (glicocorticóides, hormônios tireoidianos, esteróides sexuais, insulina) e fatores metabólicos como glicose, ácidos graxos livres, aminoácidos e gordura corporal (Le Roith e col., 2001; Melmed & Kleinberg, 2002; Da Silva & Lengyel, 2003; Da Silva, 2004; Goldman, 2004).

A principal função do GH é promover o crescimento longitudinal mediado pela produção do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), principalmente no fígado e em tecidos periféricos. O GH pode atuar de maneira autócrina / parácrina, atuando no local onde foi secretado, ou nas células-alvo adjacentes, mediante a produção de IGF-I local. Pode ainda atuar de maneira endócrina, ou seja, as células secretoras liberam o hormônio na corrente sanguínea para atuar em todas as células-alvo do corpo, promovendo o crescimento longitudinal estimulado pela expressão de IGF-I em órgãos distantes.

O GH também desempenha funções metabólicas importantes na composição corporal, regulação do metabolismo lipídico e aumento da massa muscular cardíaca e esquelética (Yakar e col., 2000; Le Roith e col, 2001; Alberts e col., 2002; Goldman, 2004; Portes & Barbosa, 2008).

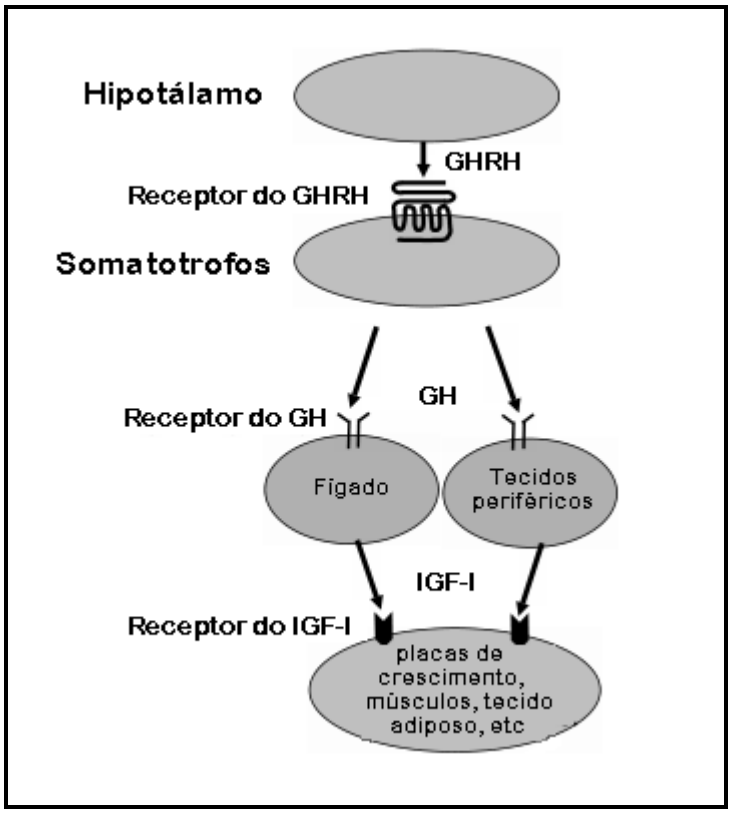

Figura 1: Esquema do controle estimulatório da secreção do GH e sua ação nos órgãos periféricos (Salvatori, 2004).

O IGF-I é um hormônio de aproximadamente 7 kDa e é o responsável pela maioria das atividades promovidas pelo GH no crescimento (Donahue e col.,1993; Klover & Henninghausen, 2007), sendo o regulador direto das funções do receptor do GH. O IGF-I participa de um sistema regulatório de *feedback* negativo no hipotálamo e na hipófise; quando em concentrações elevadas, estimula a liberação de SRIF e a inibição da tradução e secreção do gene do GH na hipófise anterior. Consequentemente, quando há alterações nos níveis de GH produzido, a liberação de IGF-I também é afetada (Donahue e col., 1993; Melmed & Kleinberg, 2002).

O funcionamento inadequado de algum dos genes que respondem pela produção dos diferentes componentes do eixo GH/IGF-I, pode levar a diferentes quadros clínicos de retardo de crescimento (Boguszewski, 2001). A deficiência de GH (DGH) é a deficiência de hormônios pituitários mais frequente e o quadro clínico durante a infância é representado por peso corpóreo comprometido, com discreta adiposidade abdominal e reduzida massa muscular, com velocidade de crescimento geralmente abaixo de 4 cm/ano para a idade cronológica, etc. A deficiência de GH em adultos é caracterizada por composição corporal anormal, redução da massa magra, sobrepeso, redução da capacidade física, entre outros (Da Silva, 2004) Esta deficiência pode ter causas congênitas ou adquiridas, ser completa ou parcial e os sintomas incluem diminuição da massa muscular, do volume líquido extracelular e da densidade óssea, fadiga, falta de concentração, perda de memória, aumento dos fatores de risco cardiovascular, aumento da adiposidade abdominal, resistência à insulina, entre outros (Melmed & Kleinberg, 2002; Da Silva, 2004).

Os principais objetivos da terapia para a DGH são a normalização do crescimento durante a juventude, até atingir o tamanho normal de um indivíduo na idade adulta, além de garantir uma melhor qualidade de vida para esses indivíduos (Kemp, 2010). Durante muito tempo utilizou-se GH extraído de hipófise de cadáver para o tratamento da DGH, porém o suprimento do hormônio era escasso, o tratamento caro e geralmente feito com doses insuficientes. Seu uso foi suspenso em 1985 por estar associado à indução da doença de Creutzfeldt-Jakob, quando o GH extraído está contaminado por príons, que são transmitidos na administração do hormônio, e que resultou na morte de vários pacientes (Melmed & Kleinberg, 2002). Desde 1985, com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, houve um avanço significativo no tratamento da DGH, uma vez que tornou-se possível sintetizar grandes quantidades do hormônio puro, aumentando sua disponibilidade e é hoje o tratamento padrão para a doença (Kemp, 2010).

Entretanto, a administração do hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH) apresenta algumas desvantagens, como os dispendiosos processos de purificação e a necessidade de frequentes injeções. O tratamento ideal para a deficiência de GH seria aquele em que deveria ser evitado este tipo de inconveniente, e fosse utilizado um mecanismo de liberação da proteína semelhante ao processo natural, visando também garantir uma melhor qualidade

de vida aos pacientes que são estritamente dependentes de uma terapia parenteral por um longo período da vida (Bellini e col., 2003; Peroni e col., 2005; Oliveira e col., 2010).

Uma alternativa a este tipo de tratamento é a terapia gênica, que possui um potencial de correção dos defeitos genéticos, além de haver a possibilidade de evitar as desvantagens do tratamento padrão. A terapia gênica consiste na introdução de genes funcionais em células específicas de um indivíduo. Esta transferência de material genético visa a reposição de um gene defeituoso/ausente ou a introdução de novas funções na célula. A finalidade principal deste tipo de terapia é o tratamento de doenças humanas hereditárias ou adquiridas, mediante a secreção da proteína de interesse *in vivo* (Edelstein e col., 2004; Peroni e col., 2005; Van Gaal e col., 2006; Edelstein e col., 2007).

Dependendo da natureza do tecido-alvo e do tipo de aplicação, existem duas metodologias para a transferência gênica: *in vivo* e *ex vivo* (Figura 2). Na terapia gênica *ex vivo*, as células são removidas, cultivadas *in vitro,* modificadas com o gene de interesse, selecionadas e reimplantadas *in vivo.* Na terapia gênica *in vivo*, os genes funcionais são inseridos diretamente nas células do tecido-alvo (Strachan & Read, 1999).

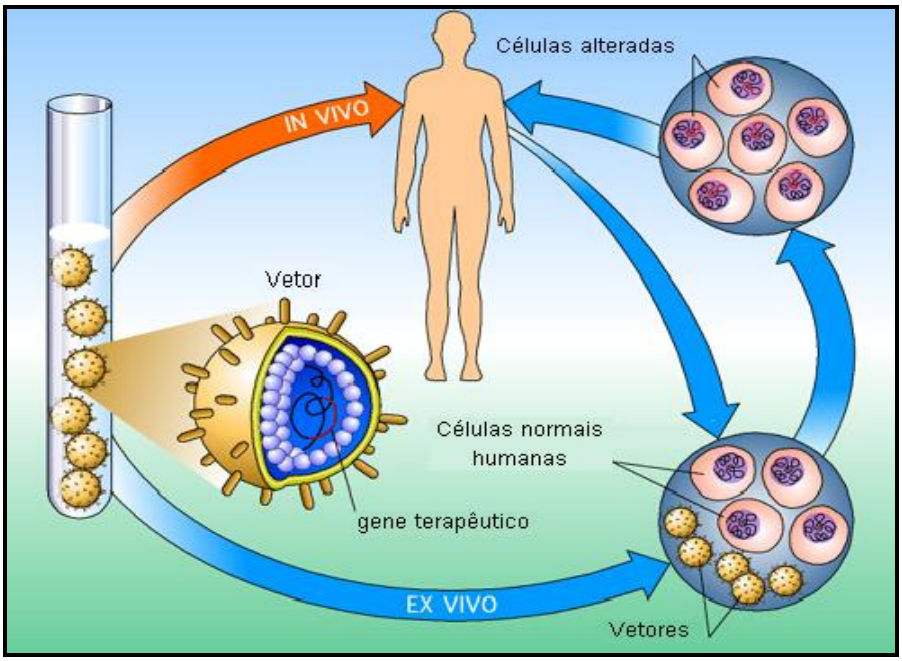

Figura 2: Representação das metodologias de transferência gênica (adaptado de Proyecto Biosfera).

O sucesso da terapia gênica depende da eficiência de inserção dos genes nas células de interesse, sem causar injúrias celulares, mutações oncogênicas ou inflamações. Uma das limitações é a escolha do vetor, que é o veículo de entrega do gene de interesse nas células-alvo, e a sua construção, ou seja, a inserção de um gene terapêutico. O vetor ideal deve seguir os seguintes princípios: ser específico para a célula-alvo, estável, capaz de ser produzido em grandes quantidades e expressar o gene de interesse a longo prazo, sem produzir efeitos citotóxicos, inflamações ou respostas imunológicas, além de possuir um mecanismo para regular a expressão do transgene (Prud'homme e col., 2006; Kaji & Leiden, 2001).

Os vetores carregam, além do gene de interesse, outros elementos genéticos importantes para sua manutenção e expressão. Podem ser de origem viral (retrovírus, adenovírus, etc) ou não viral (plasmídeos). A escolha depende da natureza do tecido-alvo e do tipo de aplicação. Os vetores não-virais possuem várias vantagens em relação aos vetores virais, pois são mais fáceis de serem construídos, podem ser produzidos mais facilmente em larga escala, são mais flexíveis em relação ao tamanho do DNA a ser transferido, mais seguros *in vivo* e menos imunogênicos. Entretanto, os vetores não-virais são menos eficientes na expressão do transgene que os de origem viral, principalmente quando utilizados *in vivo* (Nardi e col., 2002; Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 2003; Peroni e col., 2005).

Um dos métodos de transferência gênica não-viral mais utilizados atualmente é a injeção direta de DNA plasmidial ou *naked DNA*, que consiste em um plasmídeo, comumente passível de replicação em sistemas bacterianos, que contém um gene de interesse sob o controle de vários elementos regulatórios. É um método simples e prático, de relativo baixo custo, cujo potencial pode ser inclusive verificado pelo seu crescente aumento nos protocolos clínicos de terapia gênica, correspondendo a 14% desses protocolos em 2004 e a 18% dos mesmos em 2007 (Edelstein e col., 2004; Edelstein e col., 2007). Pode ser realizado em diversos tecidos como músculo, pele, fígado, entre outros. Destes, o músculo é o tecido mais utilizado por oferecer várias vantagens, como ser de fácil acesso, constituir mais de 40% de toda a massa corpórea, ser altamente vascularizado, possuir a capacidade de produzir e secretar proteínas que podem atingir a circulação e um "*turnover*" mais lento das fibras musculares, o que permite uma

expressão a longo prazo (Bigey e col., 2002; Fattori e col., 2002; Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 2003; Bloquel e col., 2004; Ratanamart & Shaw, 2006).

Entretanto, o potencial de utilização desta técnica para aplicação em humanos é limitada pela baixa eficiência na expressão e alta variabilidade no nível de expressão gênica. Diferentes métodos físicos são utilizados em conjunto com a injeção direta de DNA plasmidial para aumentar a eficiência desta metodologia, e uma das mais promissoras é a eletroporação ou eletrotransferência. É uma técnica segura, fácil de ser aplicada, possui baixo custo, sendo portanto uma das estratégias mais eficientes, capaz de aumentar a secreção da proteína transgênica em até 100 vezes quando comparada somente com a injeção do DNA plasmidial, além de diminuir a variabilidade de resposta entre indivíduos (Aihara & Miyazaki, 1998; Bigey & col., 2002; Bloquel e col., 2004; Ratanamart & Shaw, 2006; Miyazaki & Miyazaki, 2008).

A eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos, controlados e alternados no tecido-alvo após a injeção do DNA plasmidial, induzindo uma diferença de potencial transmembrana na célula e criando poros transientes na superfície celular. Dessa maneira, o plasmídeo é alvo de um efeito eletroforético, que promove a migração e entrada desse material genético no núcleo das células. Um certo dano ao músculo e a possível presença de inflamações estão associados ao tratamento elétrico, porém esses efeitos indesejáveis são mais evidentes quando a intensidade da corrente elétrica é alta. Podem ser visualizados os núcleos centrais das fibras musculares após uma semana do tratamento, indicando uma regeneração da área, e após um mês geralmente o músculo não apresenta nenhuma anormalidade histológica. Em condições otimizadas dos parâmetros para a eletrotransferência, é possível obter excelentes níveis de permeabilização e sobrevivência celular (Mir e col., 1999; Fattori e col., 2002; Bloquel e col., 2004; Ratanamart & Shaw, 2006).

A eficiência da transferência plasmidial no músculo é maior em animais jovens de pequeno porte. Em animais de grande porte, há uma redução na eficiência, possivelmente devida à quantidade de tecido conectivo presente no músculo, o que pode fornecer uma barreira adicional à captação do plasmídeo, com a utilização somente da eletroporação. A enzima hialuronidase, que aumenta a permeabilidade das células por catalisar a hidrólise do ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular, é utilizada em combinação com a

eletroporação, aumentando significativamente a expressão do transgene (Mc Mahon e col., 2001).

O nosso grupo tem utilizado a administração direta *in vivo* de um plasmídeo contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH), seguida de eletroporação, no músculo quadríceps direito de camundongos anões (*lit/lit*) e de camundongos anões e imunodeficientes (*lit/scid*). Em condições padronizadas de eletrotransferência foram obtidos, pela primeira vez, níveis circulatórios de 1,5 a 3,0 ng hGH/mL durante 60 dias com um aumento de peso corpóreo altamente significativo (P<0,001) de 33,1% para o grupo *lit/scid* tratado, comparado a uma queda de peso não significativa de 4,2% do grupo controle (injeção de salina seguida de eletroporação). Além disso, quando comparado o músculo quadríceps direito, o que recebeu o tratamento, do grupo tratado em relação ao grupo controle, foi observado um aumento de peso de 48% (P<0,001), além de um aumento do músculo esquerdo, não tratado, de 31%, o que sugere um efeito local (autócrino/parácrino) e sistêmico (endócrino) resultante do DNA plasmidial e da conseqüente expressão e secreção do GH (Oliveira e col., 2009; Oliveira e col., 2010).

2. OBJETIVOS

De acordo com as considerações acima, o presente trabalho teve como objetivo analisar diferenças entre os pesos dos músculos quadríceps de camundongos *lit/scid* tratados e não tratados, após a administração de DNA plasmidial contendo o gene do hGH, seguida de eletroporação, para investigar os efeitos endócrinos e parácrinos do GH derivados deste tipo de administração. Além disso, foram determinados outros parâmetros relacionados ao crescimento, tais como o peso corpóreo, o comprimento total do corpo (medido do nariz à cauda) e somente da cauda, os pesos de outros órgãos (fígado, rins, coração, baço e músculos gastrocnêmios) e os níveis de mIGF-I e de glicose. Foi também realizada uma comparação destes parâmetros obtidos em camundongos *lit/scid* tratados e não tratados e em camundongos *Scid*, além de estudar o tratamento de camundongos *lit/scid* com DNA plasmidial, ou com injeções diárias de r-hGH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- ✓ Agitador magnético modelo 258 – FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162 – MARCONI (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Autoclave vertical, modelo 103 – FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurich, Suíça);
- ✓ Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurich, Suíça);
- ✓ Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B – SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- ✓ Destilador de água, modelo 016, FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Espectrofotômetro, modelo Ultrospec 2100 pro, AMERSHAM BIOSCIENCES (Pittsburgh, PA, EUA);
- ✓ Freezer -20º C, modelo 0651 – PROSDÓCIMO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Freezer -40º C, modelo AB 240 – METALFRIO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Freezer -80º C, modelo 8425 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH, (Bethesda, EUA);
- ✓ Placas de microtitulação com fundo em “U” - DYNATECH (Chantilly, EUA);
- ✓ Ponteiras sem filtro, volumes de 10 a 1000 µL – AXYGEN (Union, EUA)
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q plus – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- ✓ Vórtex, modelo *vortex mixer*, FISHER SCIENTIFIC (Pittsburgh, PA, EUA).

3.1.2 Principais reagentes para biologia molecular

- ✓ Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Brometo de etídio – LKB – PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- ✓ Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- ✓ Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Marcador de peso molecular 100pb *Gene Ruler*™ – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- ✓ Sistema para extração de DNA maxi-prep QIAGEN – QIAGEN (Hilden, Alemanha);
- ✓ Triptona - *Bacto*™ *Tryptone* – BECTON DICKINSON (Sparks, MD, USA).

3.1.3 Materiais utilizados na administração direta de DNA plasmidial seguida de eletroporação

- ✓ Eletrodos do tipo placa (um par) de platina pura de 5,5 x 2,0 x 3,0 mm não invasivos HERAEUS VECTRA DO BRASIL (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Eletroporador de tecidos biológicos, construído *in house* (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Fio de sutura Caajara – CAAJARA (Cotia, SP, Brasil);
- ✓ Gel eletrocondutor Flexor – FLEXOR (Sertãozinho, SP, Brasil);
- ✓ Hialuronidase - Hyalozima 2.000 UTR – APSEN (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Lâminas *Chrome platinum* BIC – BIC (Manaus, AM, Brasil);
- ✓ Quetamina - *Cetamin* – SYNTEC (Hortolândia, SP, Brasil);
- ✓ Seringas BD Ultra – Fine II – BECTON DICKINSON (Franklin Lakes, NJ, EUA);
- ✓ Seringas descartáveis de 1 mL – INJEX (Ourinhos, SP, Brasil);
- ✓ Xilazina - *Xilazin* – SYNTEC (Hortolândia, SP, Brasil).

3.1.3.1 Plasmídeo utilizado

- ✓ Plasmídeo pUC-UBI-hGH, que contém o promotor da ubiquitina C (posição – 1464 a -15) e a sequência genômica do hGH (2152 pb). Foi gentilmente cedido pelo Dr. T. G. Jensen (The Kennedy Institute, Glostrup, Dinamarca).

3.1.3.2 Animais utilizados

- ✓ Camundongos anões imunodeficientes da linhagem CB17-Ghrhr lit/+ Prkdc scid/Bm, mais conhecidos como *lit/scid,* que possuem uma mutação espontânea de origem recessiva no cromossomo 6, que origina o nanismo (Deitel e col., 2002) e outra mutação autossômica recessiva originada no gene P*rkdc,* situada no cromossomo 16, que lhes confere uma imunodeficiência severa. Foram obtidos por intermédio do Dr. W. Beamer (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, ME, EUA).
- ✓ Camundongos da linhagem isogênica *Scid*, que possuem a mesma imunodeficiência dos camundongos *lit/scid*, porém sem a mutação que origina o nanismo.

Os animais utilizados neste trabalho, por possuírem uma imunodeficiência severa, são mantidos em microisoladores, dentro de uma área de criação controlada do Biotério do IPEN/CNEN-SP e todos os materiais utilizados para a manutenção são previamente esterilizados. São mantidos nas seguintes condições de criação:

- ⇒ Temperatura ambiente: 22 ± 2º C;
- ⇒ Iluminação artificial com ciclo circadiano de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- ⇒ Ração e água *ad libitum.*

Os grupos foram compostos por camundongos machos e fêmeas, na mesma proporção, com idade entre 60 e 90 dias. A utilização destes animais neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN (Parecer – Projeto nº 11/CEPA-IPEN/SP de 27/10/2006).

3.1.4 Material utilizado na administração de r-hGH

- ✓ Preparação de hGH recombinante altamente purificada - IPEN – CNEN / SP (São Paulo, SP, Brasil); (Ribela e col., 1993; Oliveira e col., 1999).

3.1.5 Principal reagente utilizado na dosagem de glicose

- ✓ Sistema comercial específico *glicose PAP Liquiform* – LABTEST (Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.1.6 Principal reagente utilizado na dosagem de mIGF-I

- ✓ *Quantikine mouse/rat IGF-I immunoassay* – R&D SYSTEM (Minneapolis, MN, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH

Bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas com o plasmídeo pUC-UBI-hGH. A amplificação do plasmídeo foi realizada utilizando procedimento padrão em meio LB com ampicilina e para a purificação foi utilizado o sistema comercial de maxi-prep da Qiagen.

A quantificação do plasmídeo purificado foi realizada por leitura espectrofotométrica, e antes de cada administração nos animais, foi realizada uma análise de restrição com as enzimas Bam HI e Eco RI, para verificar a presença do inserto correspondente à sequência genômica do hGH (2152 pb).

3.2.2 Pré – ensaios

Antes dos ensaios de administração de DNA plasmidial ou de injeções diárias de r-hGH, foram realizados pré-ensaios durante 10 dias consecutivos, onde os camundongos *lit/scid* foram pesados diariamente e, aqueles que apresentaram uma variação de ± 3% do peso durante este período, foram eliminados (Bellini & Bartolini, 1993; Bellini e col., 1998).

3.2.3 Administração *in vivo* do DNA plasmidial seguida de eletroporação

Os camundongos *lit/scid* foram previamente anestesiados com uma mistura de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. Os pêlos da região do músculo quadríceps direito foram raspados, o músculo foi exposto e foi injetada a enzima hialuronidase (20 U/50 µL). Após 30 minutos, foram injetados 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, solubilizado em solução salina, em um volume de 50 µL/animal. Em seguida, foi realizada a eletroporação neste músculo, utilizando os parâmetros já padronizados anteriormente: 8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo e 50 V (Oliveira e col., 2010). Os animais foram submetidos a pesagens constantes durante o tratamento.

Como controle, foi administrada solução salina em um volume de 50 µL/animal, em todos os experimentos.

3.2.4 Administração diária de hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH)

Para as administrações diárias de r-hGH, foi escolhida a dose de 2 x 5 µg/animal, por ser equivalente a uma secreção diária de aproximadamente 1,9 ng/mL de hGH (Bellini e col., 2003), próximo à secreção obtida nos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial contendo o gene do hGH (Oliveira e col., 2010).

Foram realizadas duas injeções diárias (9h e 16h) de 5 µg r-hGH, solubilizado em 50 µL de solução salina / animal, em camundongos *lit/scid* durante 28 dias consecutivos, com pesagens diárias ao longo do tratamento.

3.2.5 Realização de medidas de comprimento e obtenção de sangue e órgãos

Foram realizadas medidas de comprimento total do corpo e da cauda, enquanto os animais permaneciam anestesiados, antes do início de cada tratamento.

O sangue foi retirado via cavidade retro-orbital, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e foram realizadas as medidas finais do comprimento total do corpo e da cauda. Os seguintes órgãos foram dissecados e pesados imediatamente: rim direito e esquerdo, fígado, baço, coração, músculos gastrocnêmios direito e esquerdo e músculos quadríceps direito e esquerdo. Os camundongos *Scid* utilizados como controles de crescimento normal foram submetidos ao mesmo processo ao final do acompanhamento de 50 dias.

O sangue foi processado em plasma para dosagem de glicose e de mIGF-I.

3.2.6 Dosagem de glicose

Foi utilizado o sistema comercial específico *Glicose PAP Liquiform* para determinação de glicose. Este sistema baseia-se em uma reação oxidativa, onde ocorre a formação de um composto vermelho, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. O limite de detecção é de 0,41 mg/dL e os níveis de glicose no plasma dos animais foram determinados em um leitor de placas de microtitulação na absorbância de 490 nm.

3.2.7 Dosagem de mIGF-I

Foi utilizado o sistema *Quantikine mouse/rat* para determinação de mIGF-I no plasma dos camundongos. É um método imunoenzimático quantitativo do tipo “sanduíche”, onde uma microplaca de 96 poços é revestida com um anticorpo monoclonal específico e o anticorpo policlonal de detecção é conjugado à peroxidase. A dose mínima de detecção é de 3,5 pg/mL de mIGF-I e a leitura foi realizada em um leitor de placas de microtitulação na absorbância de 450 nm.

3.2.8 Cálculo da porcentagem de crescimento máximo obtido

Os parâmetros de crescimento avaliados para os camundongos *lit/scid* tratados com o DNA plasmidial foram comparados aos de camungongos *Scid*, utilizados para a determinação de valores de crescimento de um camundongo normal, denominados como crescimento máximo possível (C.M.P.).

A porcentagem de crescimento máximo obtido (C.M.O), em peso ou comprimento, para camundongos tratados com o DNA plasmidial foi calculada por meio da seguinte fórmula:

(C.M.P.) Peso *Scid* – Peso controle = X

(C.M.O.) Peso tratado – Peso controle = Y

Porcentagem de crescimento máximo ➡ $\frac{Y}{X} \times 100$

3.2.9 Análise estatística

As comparações entre todos os parâmetros de crescimento foram realizadas por meio do teste *t* de *Student*, considerando não-significativo $P > 0,05$. Os dados foram reportados como valores médios ± desvio-padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do crescimento de camundongos *lit/scid*, após a injeção direta de DNA plasmidial ou salina, seguida de eletroporação

Utilizando as condições padronizadas anteriormente em nosso laboratório para a injeção direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, no músculo quadríceps direito de camundongos *lit/scid* (Oliveira e col., 2009; Oliveira e col., 2010), foi realizado um experimento durante 50 dias com pesagem dos animais ao longo do tratamento, para avaliar a variação de peso corpóreo. Como pode ser observado na Figura 3, foi obtido um aumento de 3,10 g (33,4%), entre o peso final e o inicial do grupo tratado com o DNA plasmidial, apresentando uma inclinação da curva de 0,0642 ± 0,0056 g / camundongo / dia. Para o grupo salina, a diferença foi de 1,03 g (11%), e a inclinação da curva de 0,0213 ± 0,0008 g / camundongo / dia, com uma diferença significativa (P<0,005) entre as inclinações dos dois grupos.

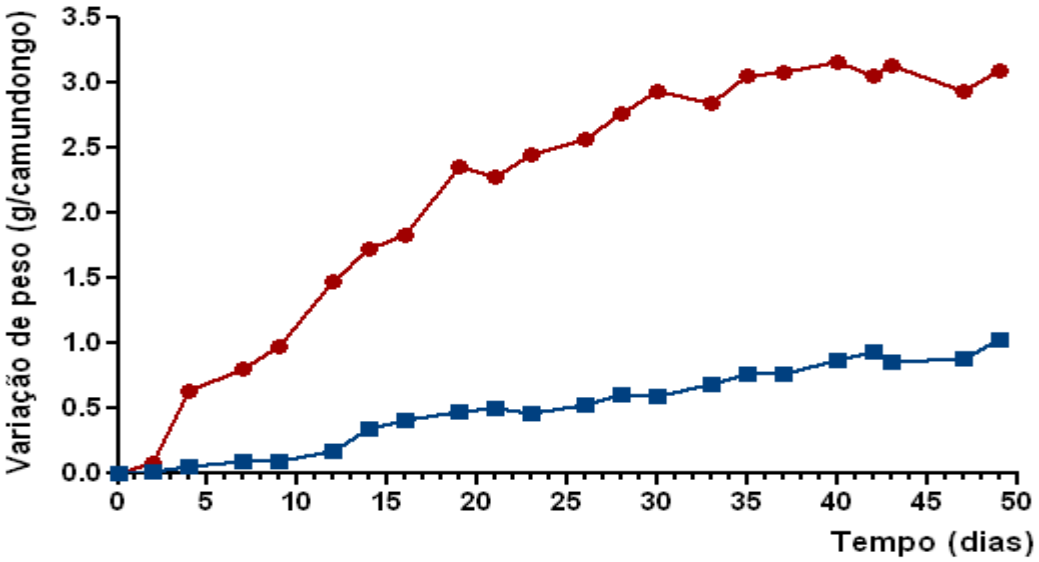

Figura 3: Variação de peso de camundongos *lit/scid* (n=13 animais/grupo), após administração única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ( ) ou de salina ( ), seguida de eletroporação.

O aumento médio do comprimento da cauda foi de 5,6% para o grupo tratado e de 2,1% para o grupo controle, e o comprimento total, medido do nariz à cauda, apresentou um aumento médio de 9,2% para o grupo tratado e de 1,8% para o grupo salina (Tabela 1). Todos os parâmetros de crescimento avaliados quando comparadas as medidas finais em relação às iniciais do mesmo grupo, foram altamente significativos ($P<0,001$) para o grupo tratado e significativo apenas o aumento de peso corpóreo para o grupo controle.

Quando comparadas as medidas finais entre o grupo tratado com o DNA plasmidial e controle, foram significativas ($P<0,001$) o aumento de peso corpóreo e o comprimento total do corpo.

Tabela 1: Parâmetros de crescimento de camundongos *lit/scid*, após 50 dias da administração intramuscular de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina, seguida de eletroporação, e de camundongos *Scid* com 3 meses e ½ de idade e sem tratamento (n=13 animais / grupo)

Parâmetro de crescimento	Antes do tratamento (média ± DP)	Final do tratamento (média ± DP)	Aumento x inicial (%)	P*[1]
Peso corpóreo (g)				
Controle (salina)	9,37 ± 0,85	10,40 ± 1,06	11,0	P<0,02
pUC-UBI-hGH	9,29 ± 1,26	12,39 ± 0,90	33,4	P<0,001
Scid	____	19,18 ± 2,42	____	____
Comprimento da cauda (cm)				
Controle (salina)	6,05 ± 0,17	6,18 ± 0,36	2,1	n. s. *[2]
pUC-UBI-hGH	6,02 ± 0,20	6,36 ± 0,18	5,6	P<0,001
Scid	____	7,96 ± 0,44	____	____
Comprimento total do corpo (cm)				
Controle (salina)	12,48 ± 0,43	12,71 ± 0,61	1,8	n. s. *[2]
pUC-UBI-hGH	12,47 ± 0,32	13,62 ± 0,33	9,2	P<0,001
Scid	____	16,23 ±0,61	____	____

*[1] Entre final e antes do tratamento; *[2] n. s. (não significativo): P>0,05.

Após a retirada do sangue para quantificação de glicose e de mIGF-I, foram dissecados e pesados imediatamente os seguintes órgãos: músculos quadríceps direito e esquerdo, músculos gastrocnêmios direito e esquerdo, baço, fígado, rins direito e esquerdo e coração.

Quando foram comparados os pesos dos órgãos do grupo tratado com o plasmídeo pUC-UBI-hGH em relação aos do grupo salina (controle), o músculo quadríceps direito, rins direito e esquerdo, baço, fígado e coração apresentaram diferenças altamente significativas (P<0,001). O músculo quadríceps esquerdo do

grupo tratado foi significativamente maior (P<0,005) e não houve diferença significativa (P>0,05) de peso dos músculos gastrocnêmios direito e esquerdo entre os dois grupos (Tabela 2).

A porcentagem relativa do peso do órgão sobre o peso total foi superior para todos os órgãos do grupo tratado com o DNA plasmidial, exceto para os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo do grupo controle que foram ligeiramente superiores. Observou-se um aumento mais pronunciado para o músculo quadríceps direito do grupo tratado com o DNA plasmidial, quando comparado com o grupo de camundongos *Scid*, indicando uma ação autócrina / parácrina e sistêmica (endócrina) do GH ou do IGF-I secretado localmente.

Tabela 2: Pesos de órgãos dissecados de camundongos *lit/scid* após 50 dias da administração intramuscular de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguida de eletroporação, e de camundongos Scid com 3 meses e ½ de idade sem tratamento (n=13 animais / grupo)

Órgão	Média dos pesos ± DP (mg)			Peso do órgão/peso total (%)		
	Controle (salina)	pUC-UBI-hGH	Scid	Controle (salina)	pUC-UBI-hGH	Scid
Músculo quadríceps direito	50,05 ± 9,57	74,14 ± 13,06 *[1]	105,79 ± 22,35	0,48	0,59	0,55
Músculo quadríceps esquerdo	38,92 ± 6,11	50,97 ± 12,29 *[2]	96,25 ± 18,22	0,38	0,41	0,50
Músculo gastrocnêmio direito	58,35 ± 6,98	64,21 ± 11,31 *[3]	105,92 ± 20,73	0,56	0,52	0,55
Músculo gastrocnêmio esquerdo	57,91 ± 9,81	59,45 ± 7,94 *[3]	91,21 ± 20,93	0,56	0,48	0,48
Rim direito	58,95 ± 7,78	77,15 ± 14,70 *[1]	152,03 ± 28,20	0,56	0,62	0,79
Rim esquerdo	56,30 ± 8,02	73,15 ± 13,59 *[1]	148,64 ± 29,35	0,54	0,59	0,77
Baço	41,92 ± 9,42	63,50 ± 12,89* [1] *[4]	82,45 ± 16,90	0,41	0,51	0,43
Fígado	341,65 ± 36,85	452,20 ± 63,42 *[1]	824,81 ± 128,20	3,30	3,65	4,30
Coração	47,56 ± 3,54	58,76 ± 6,00 *[1]	112,22 ± 16,95	0,46	0,47	0,59

Significância entre o grupo tratado (pUC-UBI-hGH) e controle (salina): *[1] para P<0,001, *[2] para P<0,005; *[3] para não significativo (P>0,05); *[4] n=10 (3 animais com baço de tamanho anormal).

A porcentagem de crescimento máximo dos órgãos e tecidos avaliados dos camundongos *lit/scid* tratados em relação aos camundongos normais *Scid* encontra-se na Tabela 3. O grupo tratado apresentou um aumento do peso corpóreo de 22,7% e um aumento do comprimento total do corpo de 25,9%, em relação aos camundongos *Scid*, que evidenciam taxas significativas de crescimento. O músculo quadríceps direito, onde é realizada a injeção do DNA plasmidial, apresentou uma das maiores taxas de crescimento (43,2%), e esta é diretamente derivada do efeito autócrino/parácrino e endócrino do GH observado com a utilização desta técnica. Os órgãos dos camundongos do grupo tratado que tiveram um aumento de peso superior a 20% em relação aos *Scid* foram o baço e o fígado.

Tabela 3: Porcentagem de crescimento máximo dos órgãos e tecidos obtido nos camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH, após 50 dias, comparados com camundongos normais (*Scid)* de mesma idade (n=13 animais / grupo)

Parâmetros	Salina	pUC-UBI-hGH	*Scid*	Crescimento máximo obtido (%)*[1]
Peso corpóreo (g)	10,40 ± 1,06	12,39 ± 0,90	19,18 ± 2,42	22,7
Comprimento da cauda (cm)	6,18 ± 0,36	6,36 ± 0,18	7,96 ± 0,44	10,1
Comprimento total do corpo (cm)	12,71 ± 0,61	13,62 ± 0,33	16,23 ± 0,61	25,9
Músculo quadríceps direito (mg)	50,05 ± 9,57	74,14 ± 13,06	105,79 ± 22,35	43,2
Músculo quadríceps esquerdo (mg)	38,92 ± 6,11	50,97 ± 12,29	96,25 ± 18,22	21,0
Músculo gastrocnêmio direito (mg)	58,35 ± 6,98	64,21 ± 11,31	105,92 ± 20,73	12,3
Músculo gastrocnêmio esquerdo (mg)	57,91 ± 9,81	59,45 ± 7,94	91,21 ± 20,93	4,6
Rim direito (mg)	58,95 ±7,78	77,15 ± 14,70	152,03 ± 28,20	19,6
Rim esquerdo (mg)	56,30 ± 8,02	73,15 ± 13,59	148,64 ± 29,35	18,3
Baço (mg)	41,92 ± 9,42	63,50 ± 12,89	82,45 ± 16,90	53,2
Fígado (mg)	341,65 ± 36,85	452,20 ± 63,42	824,81 ± 128,20	22,9
Coração (mg)	47,56 ± 3,54	58,76 ± 6,00	112,22 ± 16,95	17,3

*[1] As porcentagens de crescimento máximo obtido foram calculadas considerando que as diferenças entre o grupo de camundongos *Scid* e *lit/scid* controles representariam os crescimentos máximos possíveis (100%), como melhor descrito em Métodos .

4.2 Comparação entre o crescimento obtido após a administração direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, ou após injeções de hGH recombinante

Foi realizado um segundo experimento para comparar os efeitos de uma administração única do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, com administrações diárias de hGH recombinante (r-hGH), durante 28 dias.

A administração direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina foi realizada nas condições já padronizadas anteriormente, e para o grupo tratado com r-hGH foram realizadas 2 injeções intraperitoneais diárias de 5 µg de r-hGH em camundongos *lit/scid.* Foram feitas pesagens diárias para determinar a variação de peso de cada grupo.

Na Figura 4, são apresentadas as variações de peso dos grupos tratados com o DNA plasmidial, salina ou r-hGH. A diminuição do peso no início das curvas dos grupos tratados com DNA ou salina é claramente devida à cirurgia a que foram submetidos, sendo que o mesmo não aconteceu com os animais do grupo tratado com r-hGH.

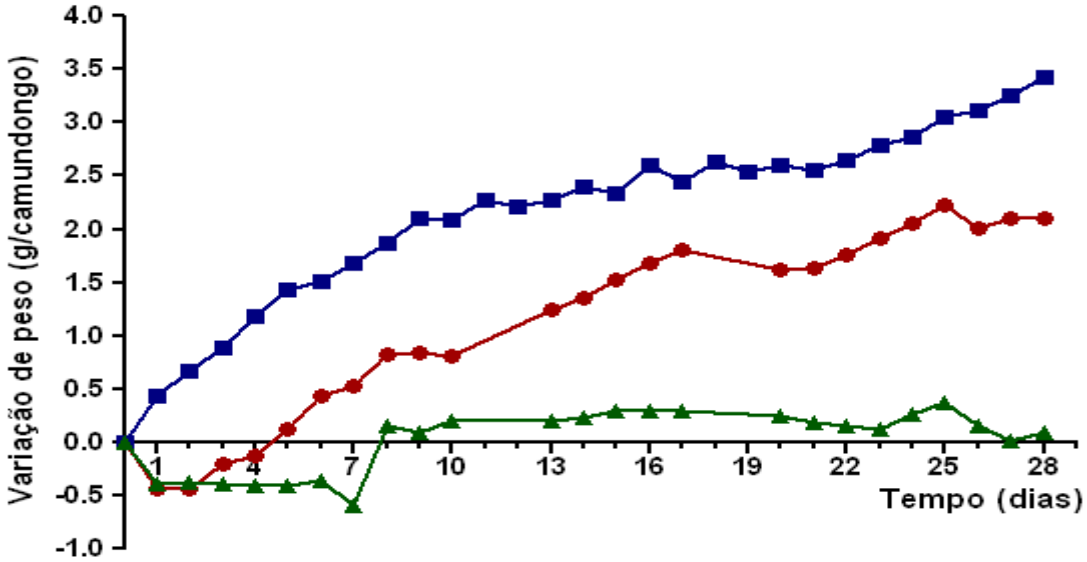

Figura 4: Variação de peso de camundongos *lit/scid* após administração única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH (●) ou de salina (▲), seguida de eletroporação, ou após duas injeções diárias de 5 µg de r-hGH (■), durante 28 dias.

Neste experimento, quando avaliados os pesos corpóreos finais em relação aos iniciais, houve um aumento significativo do grupo tratado com o pUC-UBI-hGH de 23,1% (P<0,01) e a inclinação da curva de variação de peso foi de 0,094 ± 0,006 g / animal / dia; para o grupo tratado com r-hGH um aumento de 35,5% (P<0,001) e uma inclinação da curva de 0,095 ± 0,006 g / animal / dia. O peso do grupo controle aumentou 0,9% (P<0,05), ao final do tratamento e apresentou uma inclinação da curva de 0,022 ± 0,005 g / animal / dia. Os pesos corpóreos finais foram significantemente maiores para o grupo tratado com o DNA plasmidial (P<0,005) e com r-hGH (P<0,001), quando comparados com o grupo controle.

As medidas iniciais do comprimento da cauda e do comprimento total do corpo não foram determinadas para o grupo tratado com r-hGH, uma vez que estes animais não foram anestesiados para a injeção do hormônio recombinante. Foram significativos para o grupo tratado com o DNA plasmidial, o aumento do comprimento da cauda (P<0,001) e do comprimento total do corpo (P<0,005), quando analisadas as medidas finais em relação às iniciais. Porém estes parâmetros não foram significativos quando comparados ao grupo controle no final do tratamento (Tabela 4).

Quando comparados os parâmetros de crescimento entre os grupos tratados com DNA ou com o hormônio recombinante, foi significativo o aumento de peso corpóreo do grupo do r-hGH (P<0,005) em relação ao grupo do DNA plasmidial, porém não foram obtidas diferenças significativas para o comprimento da cauda e comprimento total do corpo entre os dois grupos.

Tabela 4: Parâmetros de crescimento de camundongos *lit/scid*, após 28 dias da administração única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina, seguida de eletroporação, ou de injeções diárias de hGH recombinante (r-hGH) (2x5 µg/dia/animal)

Parâmetro de crescimento	Antes do tratamento (média ± DP)	n *[1]	Final do tratamento (média ± DP)	n *[2]	Aumento versus inicial (%)	P*[3]
Peso corpóreo (g)						
Controle (salina)	8,53 ± 0,98	8	8,61 ± 1,34	5	0,9	P<0,05
pUC-UBI-hGH	9,35 ± 1,25	10	11,51±1,71	7	23,1	P<0,01
r-hGH	10,23 ± 0,92	11	13,86 ± 0,95	11	35,5	P<0,001
Comprimento da cauda (cm)						
Controle (salina)	5,60 ± 0,32	8	6,10 ± 0,44	5	8,9	P<0,05
pUC-UBI-hGH	5,72 ± 0,26	10	6,27 ± 0,21	7	9,6	P<0,001
r-hGH	——	11	6,57 ± 0,38	11	——	——
Comprimento total do corpo (cm)						
Controle (salina)	11,85 ± 0,61	8	12,63 ± 0,68	5	6,6	n. s. *[4]
pUC-UBI-hGH	12,08 ± 0,61	10	13,24 ± 0,69	7	9,6	P<0,005
r-hGH	——	11	13,75 ± 0,53	11	——	——

*[1] Antes do tratamento; *[2] final do tratamento; *[3] entre final e antes do tratamento; *[4] n. s. (não – significativo): P>0,05.

As diferenças dos pesos dos órgãos dissecados do grupo tratado com DNA plasmidial, quando comparadas com o grupo controle, foram significativas para os seguintes órgãos: músculo quadríceps direito ($P<0,02$), músculos gastrocnêmio direito e esquerdo ($P<0,02$), rim direito ($P<0,02$) e fígado ($P<0,05$). E quando comparado o grupo tratado com r-hGH e controle, apenas o baço não apresentou diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 5).

Os órgãos do grupo tratado com o r-hGH que não apresentaram diferenças significativas de peso, quando comparados com o grupo tratado com o DNA plasmidial, foram o rim direito, rim esquerdo, baço e músculo quadríceps direito. Foram significativos os aumentos de peso do quadríceps esquerdo ($P<0,005$), fígado ($P<0,001$), coração ($P<0,001$), gastrocnêmio direito ($P<0,001$) e esquerdo ($P<0,02$).

A porcentagem relativa ao peso do órgão sobre o peso total foi superior para o grupo tratado com o DNA plasmidial para os rins direito e esquerdo e músculo quadríceps direito, neste último possivelmente devido à uma somatória de efeitos locais (autócrino e parácrino) com os efeitos sistêmicos (endócrinos) do GH ou dos seus efetores, como o IGF-I, após a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH.

Tabela 5: Pesos de órgãos dissecados de camundongos *lit/scid*, após 29 dias da administração intramuscular de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina, seguida de eletroporação, ou após injeções diárias de hGH recombinante (r-hGH) (2 x 5 µg / dia / animal)

Órgão	Média dos pesos ± DP (mg)			Peso do órgão/peso total (%)		
	Controle (salina) n=5	pUC-UBI-hGH n=7	r-hGH n=11	Controle (salina) n=5	pUC-UBI-hGH n=7	r-hGH n=11
Músculo quadríceps direito	47,82 ± 15,40	73,07 ± 15,44 *[3]	84,73 ± 14,30*[1]	0,56	0,63	0,61
Músculo quadríceps esquerdo	46,80 ± 24,02	57,71 ± 12,90 *[5]	83,55 ± 19,03 *[2]	0,54	0,50	0,60
Músculo gastrocnêmio direito	40,82 ± 9,70	56,20 ± 8,30 *[3]	80,82 ± 13,01 *[1]	0,47	0,49	0,58
Músculo gastrocnêmio esquerdo	37,22 ± 7,86	53,82 ± 10,98 *[3]	73,18 ± 17,49 *[1]	0,43	0,47	0,53
Rim direito	58,82 ± 7,81	86,57 ± 19,09 *[3]	94,45 ± 17,23 *[1]	0,68	0,75	0,68
Rim esquerdo	61,64 ± 4,28	77,70 ± 20,29 *[5]	96,82 ± 19,19 *[2]	0,72	0,68	0,70
Baço	74,08 ± 43,41	64,73 ± 19,69 *[5]	75,91 ± 36,76 *[5]	0,68	0,56	0,55
Fígado	308,70 ± 65,54	432,74 ± 105,27 *[4]	627,64 ± 88,52 *[1]	3,59	3,76	4,53
Coração	49,22 ± 14,09	57,46 ± 16,46 *[5]	87,27 ± 14,17 *[1]	0,57	0,50	0,63

Significância entre o grupo tratado com pUC-UBI-hGH ou com rhGH e controle: *[1] P<0,001; *[2] P<0,005; *[3] P<0,02; *[4] P<0,05; *[5] não-significativo (P>0,05).

4.3 Dosagem de glicose no plasma de camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, juntamente com eletroporação, ou com r-hGH e de camundongos somente imunodeficientes (*Scid*)

A taxa de glicose no plasma de camundongos *lit/scid* após tratamento com o DNA plasmidial apresentou um aumento significativo (P<0,05), quando comparada ao grupo controle (salina) após 7 dias da administração, e não foi significativa para o grupo tratado com r-hGH e controle(Tabela 6). Após 28 dias, essas dosagens não apresentaram diferenças significativas, quando comparados o grupo tratado com DNA plasmidial com os grupos controle e tratado com r-hGH. No experimento de administração do DNA plasmidial durante 50 dias não houve diferenças significativas entre o grupo tratado e controle, ou com os camundongos *Scid* sem tratamento e da mesma idade. Foi observada, porém, uma alta variabilidade de resposta entre os animais e um aumento da concentração de glicose com a idade, com coeficiente de correlação significativo (P<0,01).

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de glicose em camundongos *lit/scid* tratados com pUC-UBI-hGH ou salina, juntamente com eletroporação, ou com r-hGH, e em camundongos *Scid* sem tratamento.

Grupo	Duração do tratamento (dias)	n	Glicose (mg/dL)
Salina	7	3	79,09 ± 1,57
pUC-UBI-hGH	7	3	93,79 ± 2,66
r-hGH	7	3	79,55 ± 8,42
Salina	28	5	89,36 ± 24,06
pUC-UBI-hGH	28	7	102,40 ± 20,14
r-hGH	28	11	104,97 ± 12,34
Salina	50	13	104,38 ± 19,82
pUC-UBI-hGH	50	13	117,02 ± 18,73
Scid	___	13	101,85 ± 16,65

4.4 Determinação das concentrações plasmáticas de mIGF-I em camundongos *Scid* e em camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, juntamente com eletroporação, ou com injeções de r-hGH

As concentrações de mIGF-I no plasma de camundongos *lit/scid* após o tratamento com o plasmídeo pUC-UBI-hGH apresentaram diferenças altamente significativas (P<0,001), quando comparadas ao grupo controle (salina) após 7, 28 e 50 dias (Tabela 7). Entre o grupo tratado com DNA plasmidial e o tratado com r-hGH, houve diferença significativa (P<0,005) nos níveis de mIGF-I após 7 dias, mas essa diferença não foi significativa no final do tratamento de 28 dias. Quando comparados os níveis de mIGF-I do grupo tratado com r-hGH e controle, foram significativas as diferenças após 7 (P<0,01) e 28 (P<0,005) dias do tratamento.

Foram também determinadas as concentrações de mIGF-I em amostras de plasma de camundongos *lit/scid* sem tratamento, com idade correspondente à dos camundongos tratados durante 50 dias com o DNA plasmidial, para comparar com os níveis de mIGF-I dos camundongos do grupo controle deste experimento, e não houve diferença significativa destas concentrações entre os dois grupos. Observamos também uma correlação significativa (P<0,05) entre a idade e os valores de mIGF-I nos animais controles.

Pode-se enfatizar portanto, que mesmo não tendo havido claramente uma normalização dos valores de mIGF-I nos camundongos tratados com o DNA ou com a proteína em relação aos camundongos *Scid,* a presença de concentrações mais elevadas no plasma dos animais injetados com o plasmídeo é um fato interessante e que merece ser melhor avaliado.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de mIGF-I em camundongos *lit/scid* após diferentes tempos da administração única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguida de eletroporação, ou injeções diárias de r-hGH e em camundongos *Scid*

Grupo de animais	mIGF-I (ng / mL)	P*[1]	P*[2]	C. V. *[3] (%)
***lit/scid* - 7 dias**				
salina (n=3)	14,0 ± 3,3	___	___	23,6
pUC-UBI-hGH (n=3)	94,2 ± 15,1	P< 0,001	P < 0,005	16,0
r-hGH (n=3)	39,3 ± 8,1	P< 0,01		20,6
***lit/scid* - 29 dias**				
salina (n=5)	17,3 ± 1,8	___	___	10,5
pUC-UBI-hGH (n=7)	92,1 ± 20,7	P< 0,001	n.s. *[4]	22,5
r-hGH (n=7)	73,4 ± 27,1	P< 0,005		36,9
***lit/scid* - 50 dias**				
salina (n=10)	27,2 ± 8,1	___	___	29,8
pUC-UBI-hGH (n=10)	119,3 ± 19,0	P< 0,001	___	15,9
sem tratamento (n=6)	24,0 ± 6,7	n.s. *[5]	___	27,9
***Scid* sem tratamento (n=7)**	371,4 ± 45,6	P<0,001 *[6]	___	12,3

*[1] Significância entre o grupo tratado com pUC-UBI-hGH ou r-hGH e controle;
*[2] Significância entre o grupo tratado com pUC-UBI-hGH e r-hGH;
*[3] C. V: coeficiente de variação; *[4] n. s. (não-significativo) : P> 0,05;
*[5] Significância entre o grupo *lit/scid* sem tratamento e o grupo *lit/scid* tratado com salina
*[6] Significância entre o grupo tratado com pUC-UBI-hGH após 50 dias e camundongos *Scid.*

5. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos utilizando a injeção direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, em camundongos *lit/scid* (Oliveira e col., 2009; Oliveira e col, 2010), buscou-se compreender melhor os efeitos autócrinos / parácrinos e endócrinos, resultantes desta nova estratégia de terapia para a correção dos efeitos fenotípicos resultantes da deficiência de GH, em substituição ao tratamento padrão com o hormônio recombinante.

No presente trabalho, a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, em camundongos *lit/scid,* resultou em um aumento altamente significativo (P<0,001) do peso corpóreo de 33,4% do grupo tratado, quando comparado ao aumento de 11% do grupo controle. Além disso, a inclinação de variação de peso corpóreo entre o grupo tratado com o DNA plasmidial foi significativamente diferente quando comparada com a do grupo controle (0,0642 versus 0,0213 g / animal / dia; P<0,005). Outras técnicas de medidas foram utilizadas para avaliar o crescimento além do aumento de peso corpóreo, pois este parâmetro, apesar de ser bastante utilizado para determinar a atividade biológica e a potência de preparações de GH (Bellini & Bartolini, 1993), poderia não fornecer todas as informações necessárias para avaliar o crescimento longitudinal, permitindo possíveis conclusões incorretas influenciadas pela retenção de líquido ou adiposidade (Palmer e col., 2009).

O aumento final do comprimento total do corpo do do grupo tratado (9,2%) foi altamente significativo (P<0,001) em relação ao aumento do grupo controle (1,8%). Apesar de não ter apresentado uma diferença significativa para o aumento do comprimento da cauda entre os grupos tratado (5,6%) e controle (2,1%), a única administração do DNA plasmidial, foi eficiente e garantiu um crescimento maior para a maioria dos parâmetros analisados. Este fato torna potencialmente eficaz a utilização da transferência *in vivo* deste plasmídeo para finalidade de terapia gênica de GH, além de evitar os inconvenientes das manipulações *in vitro* e do posterior transplante *in vivo*, como ocorre na transferência *ex vivo* (Ratanamart e col., 2006).

Oliveira e col. (2010) após padronizar o protocolo de administração de DNA plasmidial, seguida de eletroporação, utilizado neste trabalho, obtiveram secreção de hGH com níveis da ordem de 1,5 – 3,0 ng/mL durante 60 dias, após administração única do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação. Este tratamento portanto, além de ter proporcionado um crescimento total do corpo e aumento de peso corpóreo altamente significativos, quando comparados ao grupo controle, possui a capacidade de expressar, por pelo menos 60 dias, níveis de hGH no soro dos camundongos *lit/scid* da mesma ordem dos 1,9 ng hGH / mL obtidos após a administração de 10 µg / dia do hormônio recombinante (Bellini e col., 2003).

Os órgãos dissecados foram escolhidos baseando-se em trabalhos nos quais foram analisadas as mudanças de composição corpórea resultantes de tratamentos para normalizar o crescimento (Sondergaard e col., 2003; Palmer e col., 2009; Khan e col., 2010). Foram também dissecados o músculo quadríceps direito, por ser o órgão onde foi realizada a administração do DNA plasmidial, e o músculo quadríceps esquerdo para avaliar o crescimento resultante dos efeitos autócrinos / parácrinos e endócrinos derivados do tratamento proposto.

Após 50 dias de tratamento, o aumento do peso dos músculos quadríceps direito do grupo tratado foi 48% superior ao mesmo órgão do grupo controle, e o do músculo quadríceps esquerdo do grupo tratado foi de 31%, aumentos derivados dos efeitos locais (autócrinos/parácrinos) e sistêmicos (endócrinos) da administração de DNA plasmidial seguida de eletroporação. Porém foi observado no grupo controle um aumento de 29% do músculo quadríceps direito, em relação ao músculo quadríceps esquerdo, o que pode indicar que houve um efeito inflamatório resultante da administração de salina, seguida de eletroporação no local.

Foi observado um peso superior de todos os órgãos dissecados do grupo tratado com o DNA plasmidial, quando comparados aos do grupo controle; com diferenças significativas para o rim direito (31%), rim esquerdo (30%), baço (52%), fígado (32%) e coração (24%). Apenas os aumentos dos músculos gastrocnêmios direito (10%) e esquerdo (3%) não apresentaram diferenças significativas de peso entre os dois grupos. Os camundongos da linhagem *Scid*, apresentam a mesma imunodeficiência dos camundongos *lit/scid*, mas não possuem a mutação que

causa a deficiência de GH, e serviram como parâmetro de crescimento máximo a ser obtido após o tratamento com o DNA plasmidial.

A porcentagem relativa ao peso do órgão sobre o peso total não foi superior apenas para os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo do grupo tratado com DNA plasmidial. O peso do músculo quadríceps direito e do baço ultrapassaram a relação de peso do órgão / peso total dos camundongos *Scid*, o primeiro provavelmente em razão da administração do plasmídeo ser realizada neste músculo e portanto, estar relacionada aos efeitos autócrino / parácrino e endócrino do GH neste local. E o segundo provavelmente por ter sido observado um tamanho anormal do baço em alguns camundongos (n=3), e pode ser resultado de algum processo infeccioso ou inflamatório, em razão do baço possuir uma importante função no sistema imunológico. Apesar destes camundongos não possuírem linfócitos B e T maduros e funcionais, acreditamos que eles podem desenvolver espontaneamente algum tipo de reação imunológica (Van Duine e col., 2009).

Observando o parâmetro de crescimento máximo obtido nos camundongos *lit/scid* tratados em relação aos camundongos *Scid*, as maiores porcentagens de crescimento foram para o músculo quadríceps direito (43,2%), o que confirma a hipótese de ser em razão dos efeitos autócrinos / parácrinos e endócrinos resultantes da administração de DNA plasmidial no local. Além disso, o baço e o fígado também apresentaram porcentagens de crescimento elevadas, o que reforça a relação com os efeitos endócrinos resultantes da administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH, pelo fato destes órgãos serem considerados como os mais sensíveis à presença de níveis mais elevados de GH (Palmer e col., 2009).

Dagnaes-Hansen e col. (2002) administraram o mesmo plasmídeo pUC-UBI-hGH mediante transferência hidrodinâmica, que consiste na aplicação rápida de DNA plasmidial em um volume de solução estéril correspondente a 10% do peso do animal. Em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e *Balb c*, estes autores obtiveram valores altos de hGH no soro que atingiram um pico de aproximadamente 90 ng / mL e mantiveram-se ao redor de 43 ng / mL durante 30 dias de tratamento. Ao final deste ensaio, o peso corpóreo do grupo controle aumentou aproximadamente 13,7%, comparado a 20,1% para o grupo tratado. Quando utilizaram a mesma técnica de transferência, com o mesmo plasmídeo em camundongos imunocompetentes, foram obtidos níveis mais elevados de hGH

no soro por um período de 59 dias após a injeção. Mesmo tendo sido detectados anticorpos anti-hGH, houve um aumento sustentável dos níveis de IGF-I e o aumento de peso corpóreo foi ao redor de 40% após 29 dias da injeção de DNA. O peso do fígado destes camundongos aumentou de 5,7% para 8,3%, e o peso relativo do coração, rins, fígado, baço, pulmões e intestino, aumentou de 23,1% para 27,5%, após 17 dias de tratamento.

Apesar da transferência hidrodinâmica apresentar resultados bastante interessantes na expressão e secreção de hGH, sua aplicação apresenta problemas bastante evidentes para o uso na terapia gênica humana para a DGH (Oliveira e col., 2010).

Em nosso laboratório, após a administração direta do plasmídeo pUC-UBI-hGH, juntamente com eletroporação em camundongos imunocompetentes *lit/lit,* foram obtidos um menor aumento de peso corpóreo e da massa muscular após 32 dias do tratamento. Estes fatores podem estar relacionados a uma resposta imunológica à proteína, específica para humanos. Os camundongos imunodeficientes *lit/scid* utilizados neste trabalho, além da capacidade de expressar o hGH, possuem uma menor possibilidade de resposta imune, o que possibilita a realização de ensaios de longa duração utilizando estes animais como modelos para a terapia gênica de GH (Bellini e col., 2003; Oliveira e col., 2010).

Sondergaard e col. (2003), mediante transferência hidrodinâmica do plasmídeo pUC-UBI-hGH, em camundongos hipofisectomizados, observaram que a taxa de crescimento do grupo tratado foi semelhante à dos camundongos normais não hipofisectomizados (controles), após um período de aproximadamente 3 semanas para o peso corpóreo e de 5 semanas para o comprimento da cauda. O peso corpóreo do grupo tratado, após este período, foi de 4 a 5 g menor do que o do grupo controle, e não houve diferença significativa para o comprimento da cauda entre os grupos. Os pesos do baço, coração, pulmões e fígado dissecados foram significativamente maiores para o grupo tratado com o DNA plasmidial em relação ao grupo de camundongos hipofisectomizados não tratados, ou tratados com um plasmídeo contendo o gene da GFP (*green fluorescent protein*). Não foram encontradas diferenças significativas para o fígado, pulmões e baço, quando comparados os grupos

tratados com o DNA plasmidial e o grupo controle; somente o peso do coração foi significantemente maior para o grupo controle.

Utilizando também a transferência hidrodinâmica do plasmídeo pUC-UBI-hGH em camundongos hipofisectomizados, Khamaisi e col. (2007) observaram que houve uma correção no crescimento longitudinal, mediante a normalização do comprimento da tíbia, do tamanho da cauda e do aumento de peso corpóreo. O peso dos rins dos camundongos tratados com o DNA plasmidial foi parcialmente normalizado e aumentou aproximadamente 53% após 68 dias de tratamento. O peso do fígado foi totalmente normalizado e foi semelhante ao do grupo controle (não-hipofisectomizados). Estes autores acreditam que a normalização do tamanho do fígado pode ser em razão da maior exposição deste órgão ao IGF-I, resultante de um aumento na vascularização devido ao próprio crescimento do órgão ou a um aumento nas concentrações locais das IGFBPs (*IGF binding protein*).

No estudo comparativo entre a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH e as injeções diárias de hormônio de crescimento recombinante humano (r-hGH), foi observado que, apesar de o aumento de peso corpóreo ter sido significantemente superior para o grupo tratado com o r-hGH (35,5%) em relação ao aumento observado no grupo tratado com DNA plasmidial (23,1%), a inclinação das curvas foi praticamente a mesma para os dois tratamentos (0,095 ± 0,006 g / animal / dia para o r-hGH versus 0,094 ± 0,006 g / animal / dia para o DNA plasmidial). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos comprimentos das caudas e do corpo total ao final do tratamento entre os dois grupos tratados.

Quando comparados os pesos dos órgãos dissecados ao final do tratamento de 28 dias dos grupos tratados com DNA plasmidial e controle, foi observado um aumento significativo do rim direito (47,2%), fígado (40,2%), quadríceps direito (52,8%), músculos gastrocnêmio direito (37,7%) e esquerdo (44,6%). Para o grupo tratado com r-hGH foi significativo em relação ao grupo controle o aumento do rim direito (60,6%) e esquerdo (57,1%), fígado (103,3%), coração (77,3%), quadríceps direito (72,2%) e esquerdo (78,5%), gastrocnêmius direito (98%) e esquerdo (96,6%). Além disso, entre os dois grupos tratados, não foi observado um aumento significativo para o peso dos rins direito e esquerdo, baço e músculo quadríceps direito.

O peso do músculo quadríceps esquerdo, apesar de não ter sido significativamente superior em relação ao grupo controle, apresentou um aumento de 23,3% após quase 1 mês de tratamento, o que indica que o aumento de ambos os músculos quadríceps do grupo tratado está relacionado à uma somatória dos efeitos autócrinos / parácrinos e endócrinos derivados da administração no local do DNA plasmidial. Foi observada também uma diferença de apenas 3% entre os músculos quadríceps direito e esquerdo do grupo controle, o que diminui a possibilidade de ter ocorrido uma inflamação no órgão que recebeu a injeção de salina e eletroporação.

Com base nestes dados, é evidente que a administração de r-hGH produz um maior incremento de peso quando comparada ao tratamento com DNA plasmidial, porém deve ser enfatizado que houve um aumento para a maioria dos órgãos e tecidos avaliados após 50 dias do tratamento com DNA plasmidial em relação ao grupo controle.

Khan e col. (2010) realizaram uma comparação para avaliar as respostas de crescimento em porcos com 10 dias de idade, após a administração intramuscular, seguida de eletroporação, de diferentes doses do plasmídeo pGHRH contendo o gene do hormônio liberador de GH porcino, ou após duas injeções diárias de hormônio de crescimento porcino (pGH). Os autores observaram que ao final de 52 dias do tratamento, não havia aumento de peso significativo entre todos os grupos tratados com o DNA plasmidial ou com o pGH, e que este parâmetro foi para todos os grupos tratados significativamente superior àquele do grupo controle (plasmídeo sem o gene do GHRH). O aumento de massa corpórea magra do grupo tratado com DNA plasmidial foi 10% superior em relação ao grupo controle, não houve diferença significativa no aumento de massa corpórea magra para o grupo que recebeu a maior e a menor dose do plasmídeo e a taxa de deposição de gordura corporal foi similar entre os grupos. O aumento de peso dos órgãos ao final do tratamento foi significativo para o grupo tratado com o GH recombinante para o coração e rins, em relação ao grupo controle e tratado com pGHRH. Os autores concluíram que a utilização do plasmídeo pGHRH é efetiva em promover o crescimento de porcos jovens e evita a necessidade das injeções frequentes requeridas com o uso do hormônio recombinante.

Para avaliar a segurança do tratamento, foi realizada a dosagem dos níveis de glicose no plasma dos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial, que apesar de ter sido superior às taxas do grupo controle e tratado com r-hGH não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados ou controle ao final dos tratamentos, nem mesmo em comparação com os dos camundongos *Scid*. Este fato pode indicar que o modelo de terapia gênica proposto apresenta-se potencialmente seguro por manter sob controle os níveis glicêmicos dos camundongos tratados. A exposição crônica e acima dos níveis fisiológicos considerados normais de GH, pode de fato acarretar um antagonismo aos efeitos da insulina, aumentando a produção de glicose, mas diminuindo sua quantidade nos músculos esqueléticos. Como consequência, o aumento da concentração de glicose no plasma pode levar o indivíduo a um estado de diabetes (Jorgensen e col., 2007; Moller and Jorgensen, 2009; Jorgensen e col., 2010).

A preservação da retro-regulação (*feedback*) entre o GH e IGF-I, semelhante àquela do processo natural, é importante para manter o equilíbrio entre as concentrações dos dois hormônios (Khan e col., 2010). A dosagem de IGF-I é bastante utilizada por ser o maior mediador fisiológico dos efeitos do GH e por sua secreção estar relacionada aos níveis de GH circulantes (Sondergaard e col., 2003).

É interessante observar que os níveis de mIGF-I no plasma dos camundongos *lit/scid* do grupo tratado com o plasmídeo pUC-UBI-hGH foram sempre superiores às do tratado com r-hGH e controle durante todo o tratamento, fato que deve ser considerado, apesar de não ter sido observada uma normalização dos níveis quando comparadas às dos camundongos *Scid*.

Khan e col. (2010) verificaram após 28 dias do tratamento com o DNA plasmidial (pGHRH), comparando com repetitivas injeções de GH porcino recombinante, que a diferença entre os níveis de IGF-I entre os dois grupos tratados foram significativamente maiores quando comparados ao grupo controle, mas após 49 dias, os níveis de IGF-I foram significativamente maiores que o do grupo controle, somente para o grupo que recebeu o GH recombinante. Além disso, não houve uma diferença significativa entre os grupos que receberam a maior e a menor dose de DNA plasmidial durante todo o tratamento. Os autores verificaram que a concentração de IGF-I aumentou de acordo com a idade dos animais e o tempo de tratamento, o mesmo fato observado em nosso estudo.

A administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH (o mesmo utilizado em nosso trabalho) por outros autores, levou a uma normalização dos níveis de IGF-I, atingindo níveis próximos aos encontrados em camundongos normais no início do tratamento. Níveis muito baixos foram encontrados nos camundongos não tratados ou tratados com um plasmídeo controle (Dagnaes-Hansen e col, 2002; Sondergaard e col., 2003; Khamaisi e col., 2007).

Entre as propostas futuras para complementar este trabalho, está a otimização de uma nova via de administração para o DNA plasmidial, visando diminuir os inconvenientes da administração no músculo quadríceps direito, e a realização de um tratamento terapêutico completo, que possa levar à total correção do nanismo dos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial, com uma comparação simultânea com o tratamento convencional, mediante injeções diárias de r-hGH.

A administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH, juntamente com eletroporação, proposta no presente trabalho como alternativa ao tratamento padrão da DGH, possui portanto, um potencial de correção dos defeitos fenotípicos, com obtenção de parâmetros de crescimento próximos aos obtidos para o grupo tratado com o r-hGH, além de evitar os inconvenientes da terapia convencional, já mencionados anteriormente, como os altos custos dos processos de produção, purificação e controle, além das repetitivas injeções do hormônio recombinante.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A administração de uma dose única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletroporação, apresentou um crescimento superior para a maioria dos órgãos e tecidos avaliados após 50 dias de tratamento em relação ao grupo controle. O músculo quadríceps direito, onde é injetado o DNA plasmidial, apresentou um aumento de peso de 48%, enquanto no quadríceps esquerdo esse aumento foi de 31%. Este fato indica uma somatória dos efeitos locais (autócrinos / parácrinos) e sistêmicos (endócrinos) derivados da injeção do plasmídeo contendo o gene do hGH e sua consequente expressão e secreção.

- ✓ Ao comparar o crescimento máximo obtido após o tratamento com DNA plasmidial em camundongos *lit/scid,* em relação ao crescimento máximo possível dos camundongos *Scid,* as porcentagens foram superiores a 20% para o baço, nos músculos quadríceps direito e esquerdo, fígado, comprimento total do corpo e peso corpóreo.

- ✓ No experimento de comparação entre o grupo tratado com o DNA plasmidial e as injeções diárias de r-hGH durante 28 dias, apesar da diferença da variação de peso corpóreo ter sido significativamente superior para o grupo tratado com a proteína recombinante no final do experimento, a inclinação das curvas entre os dois grupos tratados não apresentaram diferenças significativas, assim como o comprimento da cauda e do total do corpo.

- ✓ A dosagem de glicose no plasma dos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial, ao final dos experimentos, não apresentou diferenças significativas quando comparada às taxas dos grupos controle e tratado com r-hGH, ou dos camundongos *Scid* sem tratamento, apesar de terem sido observados níveis mais elevados para o grupo tratado com o DNA plasmidial em relação aos outros grupos, foi observada uma alta variabilidade de resposta entre os animais.

- ✓ As concentrações plasmáticas de mIGF-I do grupo tratado com o plasmídeo pUC-UBI-hGH, foi superior às do grupo tratado com r-hGH após 7 e 28 dias de tratamento,.e as diferenças nas concentrações dos grupos tratados com DNA plasmidial ou com r-hGH foram sempre significativamente maiores quando comparadas ao grupo controle. Os níveis de mIGF-I sempre mais elevados no grupo tratado com DNA plasmidial em relação ao grupos tratado com r-hGH é um fato que merece maiores estudos, devido à liberação desta proteína estar relacionada às concentrações de GH circulante.

7. REFERÊNCIAS

1 AIHARA, H.; MIYAZAKI, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. ***Nature Biotechnol***., v. 9, p. 867-870, 1998.

2 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. ***Molecular biology of the cell***, New York, USA.; p. 831-906, 2002.

3 BELLINI, M.H.; BARTOLINI, P. In vivo bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf “little” mice. ***Endocrinology****,* v. 132, p. 2051-2055, 1993.

4 BELLINI, M. H.; MATHOR, M. B.; DE LUCA, M.; CANCEDDA, R.; BARTOLINI, P. Ultrasensitive *in vivo* bioassay detects bioactive human growth hormone in transduced primary human keratinocytes. ***J. Endocrinol. Invest.***, v. 21, p. 1-6, 1998.

5 BELLINI, M.H.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P. Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes. ***FASEB J***., v. 17, p. 2322-2324, 2003.

6 BIGEY, P.; BUREAU, M. F.; SCHERMAN, D. In vivo plasmid DNA electrotransfer. ***Curr. Opin. Biotechnol****.,* v. 13, p. 443-447, 2002.

7 BLOQUEL, C.; FABRE, E.; BUREAU, M.F.; SCHERMAN, D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. ***J. Gene Med****.,* v. 6, p. S11-S23, 2004.

8 BOGUSZEWSKI, C. L. Genética molecular do eixo GH-IGF-I. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab****.,* v. 45, p. 5-14, 2001.

9 DAGNAES-HANSEN, F.; HOLST, H. U.; SONDERGAARD, M.; VORUP-JENSEN, T.; FLYVBJERG, A.; JENSEN, U. B.; JENSEN, T. G. Physiological effects of human growth hormone produced after hydrodinamic gene transfer of a plasmid vector containing the human ubiquitin promotor. ***J. Mol. Med.***, v. 80, p. 665-670, 2002.

10 DA SILVA, S. R. C.; LENGYEL, A. M. J. Influência dos glicocorticóides sobre o eixo somatotrófico. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab.***, v.4, p. 388-397, 2003.

11 DA SILVA, M. E. R. Emprego do hormônio de crescimento na baixa estatura não-deficiente de GH. In: Liberman, B.; Cukiert, A. ***Fisiologia e Fisiopatologia do Hormônio de Crescimento,*** São Paulo, Br., p. 195-240, 2004.

12 DEITEL, K.; DANTZER, D.; FERGUNSON, P.; POLLACK, M.; BEAMER, W.; ANDRULIS, I.; BELL, R. Reduced growth of human sarcoma xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. ***J. Surg. Oncol.***, v. 81, p. 75-79, 2002.

13 DONAHUE, L. R.; WATSON, G.; BEAMER W. G. Regulation of metabolic water and protein compartments by insulin-like growth factor- I and testosterone in growth hormone – deficient *lit/lit* mice. ***J. Endocrinolol.***, v. 139, p. 431-439, 1993.

14 EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J.; EDELSTEIN, R. M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989 - 2004 – an overview. ***J. Gene Med***., v. 6, p. 597-602, 2004.

15 EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 - an update. ***J. Gene Med***., v. 9, p. 833-842, 2007.

16 FATTORI, E.; LA MONICA, N.; CILIBERTO, G.; TONIATTI, C. Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery. ***J. Gene Med.***, v. 27, p. 75-83, 2002.

17 GOLDMAN, J. Crescimento normal e baixa estatura- etiologia e diagnóstico diferencial. In: Liberman, B. and Cukiert, A. ***Fisiologia e Fisiopatologia do Hormônio de Crescimento***, São Paulo, Br. p. 41-63, 2004.

18 JORGENSEN, J. O. L.; MOLLER, L.; KRAG, M.; BILLESTRUP, N.; CHRISTIANSEN, J. S. Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects. ***Endocrinol. Metab. Clin. North Am***., v. 36, p. 75-87, 2007.

19 JORGENSEN, J. O. L.; RUBECK, K. Z.; NIELSEN, T. S.; CLASEN, B. F. F.; VENDELBOE. M.; HAFSTROM, T. K.; MADSEN, M.; LUND, S. Effects of GH in human muscle and fat. ***Pediatr. Nephrol***., v. 25, p. 705-709, 2010.

20 KAJI, E. H.; LEIDEN J. M. Gene and stem cell therapies. ***Jama***., v. 285, p. 545-550, 2001.

21 KEMP, S. Growth hormone deficiency. ***eMedicine Specialties***. Arkansas, Maio 2010. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/923688-print>. Acesso em 06 dez. 2010.

22 KHAMAISI, M.; SONDERGAARD, M.; SEGEV, Y.; DAGNAES-HANSEN, F.; JENSEN, T. G.; LANDAU, D.; RAZ, I.; FLYVBJERG, A. Differential effects on kidney and liver growth of a non-viral hGH-expression vector in hypophysectomized mice. ***Growth Horm. IGF Res***., v. 17, p. 279-287, 2007.

23 KHAN, A. S.; DRAGHIA – AKLI, R.; SHYPAILO, R. J.; ELLIS, K. I.; MERSMANN, H.; FIOROTTO, M. L. A Comparison of the growth responses following intramuscular GHRH plasmid administration versus daily growth hormone injections in young pigs. ***Mol. Ther***., v. 10, p. 327-333, 2010.

24 KLOVER, P.; HENNINGHAUSEN, L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5 a/b in muscle: a role for autocrine / paracrine insulin-like growth factor I. ***Endocrinology***, v. 4, p. 1489-1497, 2007.

25 LE ROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J.; BUTLER, A. The somatomedin hypothesis: 2001. ***Endocr. Rev.***, v. 22, p. 53-74, 2001.

26 McMAHON, J. M.; SIGNORI, E.; WELLS, K. E.; FAZIO, V. M.; WELLS, D. J. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase – increased expression with reduced muscle damage. ***Gene Ther.,*** v. 8, p. 1264-1270, 2001.

27 MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: Larsen, P. R., Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. ***Williams Textbook of Endocrinology*****,** Philadelphia, USA. p. 177-279, 2002.

28 MIR, L. M.; BUREAU, M. F.; GEHL J.; RANGARA, R.; ROUYLL, D.; CAILLAUD, J. M.; DELAERE, P.; BRANELLEC, D.; SCHWARTZ, B.; SCHERMAN, D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, v. 96, p. 4262-4267, 1999.

29 MIYAZAKI, S.; MIYAZAKI J. In vivo electrotransfer into muscle. ***Develop. Growth Differ.,*** v. 50, p. 479-483, 2008.

30 MOLLER, N.; JORGENSEN, J. O. L. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. ***Endocr. Rev.,*** v. 30, p. 152-177, 2009.

31 NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A.; DA SILVA, E. F. A. Terapia gênica. ***Ciência & saúde coletiva***, v. 7, p. 109-116, 2002.

32 OLIVEIRA, J. E.; SOARES, C.R.J.; PERONI, C.N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I. M. C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M. H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R. R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmatic space. ***J. Chromat. A,*** v. 852, p. 441-450, 1999.

33 OLIVEIRA, N.A.J.; CECCHI, C.R.; HIGUTI, E.; BARTOLINI, P.; PERONI,C.N. Sustained hGH expression after electrotransfer of naked DNA into dwarf “little” mouse skeletal muscle. ***Mol. Ther.,*** v. 17, p. 557-557, 2009.

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

35 PALMER, A. J.; CHUNG, M.; LIST, E. O.; WALKER, J.; OKADA, S.; KOPCHICK, J. J.; BERRYMAN, D. E. Age related changes in body composition of bovine growth hormone transgenic mice. ***Endocrinology,*** v. 150, p. 1353-1360, 2009.

36 PERONI, C.N.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Animal models for growth hormone gene therapy. ***Curr. Gene Ther***., v. 5, p. 493-509, 2005.

37 PORTES, E. S.; BARBOSA, E. Condução do tratamento com hormônio de crescimento (GH) nos pacientes com diagnóstico de deficiência de GH (DGH) durante o período de transição da criança para o adulto. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab***., 52/5, p. 854-860, 2008.

38 Proyecto Biosfera. Ministério da Educação do governo da Espanha. Apresenta texto sobre terapia gênica. Disponível em: http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/genetica/contenido14.htm. Acesso em: 10 maio 2011.

39 PRUD’HOMME, G. J.; DRAGLIA-AKLI, R.; WANG, Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. ***Gene Ther.,***v. 14 p. 553-564, 2006.

40 RATANAMART,J.; SHAW, J.A.M. Plasmid-mediated muscle-targed gene therapy of circulating therapeutic protein replacement: a tale of the tortoise and the hare? ***Curr. Gene Ther***., v. 6, p. 1 -17, 2006.

41 RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. ***J. Immunol. Methods,*** v. 159, 9. p. 269-274, 1993.

42 SALVATORI, R. Growth hormone and IGF-I. ***Rev. Endocr. Metab. Disord.***, v. 5, p. 15-23, 2004.

43 SCHMIDT-WOLF, G. D.; SCHIMIDT-WOLF, I. G. H. Non –viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. ***Trends Mol. Med****.,* v. 9, p. 67-72, 2003.

44 SONDERGAARD, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; FLYVBJERG, A.; JENSEN, T.G. Normalization of growth in hypophysectomized mice using hydrodynamic transfer of the human growth hormone gene. ***Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab***., v. 285, p. E427 - E432, 2003.

45 STRACHAN, T.; READ, A.P. in Human molecular genetics: Gene therapy and others terapeutics approach. ***Taylor & Francis Group Press***, London, UK.; v. 2, p. 515-543, 1999.

46 VAN DUINE, R.; PEDATI, C.; GUENDEL, I.; CARPIO, L.; KEHN-HALL, K.; SAIFUDDIN, M.; KASHANCHI, F. The utilization of humanized mice models for the study of human retroviral infections. ***Retrovirology***, v. 6, ago. 2009. Disponível em: <http://www.retrovirology.com/content/6/1/76>. Acesso em 13 abril de 2010.

47 VAN GAAL, E. V. B.; HENNINK, W. E.; CROMMELIN, D. J. A.; MASTROBATTISTA, E. Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for non viral gene therapy. ***Pharm. Res****.,* v. 23, p. 1053-1074, 2006.

48 YAKAR, S.; LI LIU, J.; LE ROITH, D. The growth hormone / insulin – like growth factor – I system: implications for organ growth and development. ***Pediatr. Nephrol***. , v. 14, p. 544-549, 2000.