



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Correção fenotípica do nanismo avaliada por diferentes parâmetros de crescimento após administração de DNA plasmidial em modelo animal de deficiência isolada do hormônio de crescimento**

**Eliza Higuti**

**Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni**

**São Paulo  
2016**



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**Correção fenotípica do nanismo avaliada por diferentes parâmetros de crescimento após administração de DNA plasmidial em modelo animal de deficiência isolada do hormônio de crescimento**

**Eliza Higuti**

**Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni**

**Versão Corrigida**  
**Versão Original disponível no IPEN**

**São Paulo**  
**2016**

## DEDICO ESTE TRABALHO A:

Meus pais Kenzo e Rosa Higuti, por toda a oportunidade que me deram até hoje, e por serem minhas maiores representações de amor para toda a vida,

Ao meu irmão Marcos Higuti,

Aos meus sobrinhos Gabriel, Julia, João, Gusthavo e a pequena Luiza, que são meus pequenos tesouros,

E ao Flavio, parceiro que Deus enviou para minha vida para compartilhar meus sonhos, alegrias, tristezas e frustrações.

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço a Deus, por ter me dado força e saúde para poder finalizar mais esta meta da minha vida.

À FAPESP pelo apoio financeiro durante todos estes anos.

Agradeço à Dra. Cibele N. Peroni pela oportunidade que me deu há 8 anos atrás, por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade de aprender.

Ao Dr. Paolo Bartolini pela co-orientação durante todos estes anos no Centro de Biotecnologia (CB).

Ao Dr. Lars Aagaard, Dr. Thomas G. Jensen, Birgit, Erick, Emil e Michelle, pela oportunidade, ajuda e amizade durante o estágio na Dinamarca.

À minha amiga Claudia Cecchi, por toda a parceria durante estes anos de IPEN, por me ajudar a superar meus medos, ser minha parceira de viagem e por cuidar de mim quando mais precisei.

Ao meu amigo e sensei Nélio Oliveira, que sempre acreditou em mim, que me incentivou quando eu mais precisava e me ajudou a me fortalecer quando eu precisava e por me mostrar que a amizade verdadeira resiste à distância. E à sua esposa Vanessa por ter feito parte desta etapa importante na minha vida, e por ser também minha confidente nos momentos em que precisava de uma amiga.

À minha curica Eliana, por compartilhar horas de bancada em experimentos bem ou mal-sucedidos, pelas horas de guloseimas, momentos de lazer, risadas e revoltas.

Às minhas queridas amigas Thais, Patrícia, Renata, Gislaine, Elisangela, Sandra, Néia e ao meu querido bebê Victor, por cada pão de queijo, chás da tarde ou momentos risadinha...

À minha amiga Carol Capone, parceira de sonhos, perspectivas e frustrações.

À Dra. Maria Teresa, Dr. Carlos, Dra. Miriam e ao Dr. Perez, pelas soluções às minhas dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia: Dra. Kayo, Dra. Regina, Neide, Rute, Arlete, Felipe, Emília, Bruna, Zé Maria, Marina, Rosângela, Roberto, Marcos, Ivette, Fernanda, Beatriz, Junqueira e Flavinha.

Aos meus queridos amigos e parceiros de vida: Kátia, Juçara, Camilla, Keyde, Sandra, Andreinha, Christianne, Keli, Daniela, Lilian, Maria, Lu, Alex, Gueu, Conceição, Valmir, Jô, Roberta e Fábio.

E a todos aqueles que o nome não está aqui, mas que estiveram presentes durante alguma etapa do desenvolvimento deste trabalho, que me ajudaram ou estiveram comigo, meu muito obrigada!

**“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”**

**José de Alencar**

# **Correção fenotípica do nanismo avaliada por diferentes parâmetros de crescimento após administração de DNA plasmidial em modelo animal de deficiência isolada do hormônio de crescimento**

**Eliza Higuti**

## **RESUMO**

A deficiência de hormônio de crescimento (DGH) é a deficiência mais comum entre os hormônios pituitários. A terapia utilizada atualmente consiste de injeções diárias de hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH), entretanto esta terapia apresenta alguns inconvenientes, como a necessidade de frequentes injeções de r-hGH durante um longo período de vida, dependendo da severidade da deficiência, e o alto custo do hormônio, em razão dos dispendiosos processos de purificação. Uma alternativa ao tratamento padrão seria aquele no qual fossem evitados estes tipos de inconvenientes e o processo de liberação da proteína fosse sustentável, por um longo período e promovesse níveis normais e sustentáveis do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), o principal mediador dos efeitos do GH. Uma alternativa é a terapia gênica *in vivo*, baseada na administração de DNA plasmidial em diversos órgãos/tecidos, seguida de eletroporação. É considerada uma metodologia bastante promissora e que tem sido alvo de vários estudos para diversos tipos de deficiências sistêmicas. Neste trabalho foram realizadas diversas administrações de um plasmídeo contendo o gene do hormônio de crescimento humano, nos músculos quadríceps exposto ou tibial anterior sem exposição, seguidas de eletroporação, em camundongos anões e imunodeficientes (*lit/scid*) com 40-80 dias de idade, na tentativa de obter uma correção fenotípica do nanismo, mediante a avaliação de parâmetros de crescimento. A administração deste plasmídeo no músculo tibial anterior, em camundongos com a idade inicial de 40 dias, foi capaz de proporcionar uma normalização dos níveis de mIGF-I, quando comparados aos dos camundongos não-deficientes de GH. Além disso, foram obtidos valores de *catch-up* dos parâmetros de crescimento longitudinal de 36-77%. Visando uma maior eficiência na expressão de GH, foram construídos plasmídeos parentais, e a partir destes, foram produzidos minicírculos de DNA com os promotores do CMV e Ubiquitina C e com os cDNAs de hGH e mGH. Estes minicírculos de DNA foram transfectados em células HEK 293 e foram até 2 vezes

mais eficientes em relação aos plasmídeos convencionais com o promotor do CMV. Estes dados são bastantes promissores e abrem caminho para ensaios mais eficientes, utilizando este tipo de protocolo de terapia gênica para a DGH, visando uma normalização de todos os parâmetros de crescimento.

**palavras-chave:** terapia gênica, gene do hormônio de crescimento, IGF-I, camundongos anões e imunodeficientes, transferência gênica não-viral, eletrotransferência.

**Phenotypic correction of dwarfism mediated by different growth parameters after plasmid DNA administration in an animal model of isolated growth hormone deficiency**

**Eliza Higuti**

**ABSTRACT**

The human growth hormone deficiency (GHD) is the most common deficiency related to pituitary hormones. The current therapy is based on daily injections of recombinant human growth hormone (r-hGH). This therapy, however, presents some disadvantages, as the need for frequent injections of r-hGH during a long life time, depending on the deficiency severity and the high cost of this hormone, due to the expensive purification processes. An alternative to the standard treatment should be to avoid these inconveniences via a sustainable hormone release, acting for a long time and providing normal and sustainable levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I). A possible alternative is *in vivo* gene therapy, based on the administration of plasmid DNA in several organs/tissues, followed by electroporation. This methodology is considered very promising and has been the target of many different studies for several types of systemic deficiencies. In the present work several administrations of a plasmid containing the human growth hormone gene were carried out, in the exposed quadriceps or non-exposed tibialis cranialis muscle, followed by electroporation, using immunodeficient dwarf mice 40-80 days old. The goal was to obtain a phenotypic correction of dwarfism, through the evaluation of different growth parameters. The administration of this plasmid, in the tibialis cranialis muscle of 40 day old mice, was able to provide a normalization of mIGF-I levels, when compared to non GHD mice. Furthermore, catch-up increases of longitudinal growth parameters of 36-77% were obtained. Aiming a high efficiency on GH expression, parental plasmids were constructed and from these DNA minicircles were generated with CMV and Ubiquitin C promoter and hGH or mGH cDNA sequences. These DNA minicircles were transfected into HEK 293 cells and were even 2 times more efficient than conventional plasmids with CMV promoter. This data are very promising and pave the way for more efficient assays utilizing this type of gene therapy protocol for GHD, aiming at a normalization of all growth parameters.

**Key words:** gene therapy, human growth hormone gene, IGF-I, immunodeficient dwarf mice, non-viral gene transfer, electrotransfer.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	anticorpo
BSA	soro albumina bovina
cm	centímetros
CMV	promotor do citomegalovírus
cpm	contagem por minuto
cv	coeficiente de variação
DGH	deficiência de hormônio de crescimento
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
gDNA	DNA genômico
DMEM	meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DP	desvio padrão
ELISA	ensaio imunoenzimático
GH	hormônio de crescimento
hGH	hormônio de crescimento humano
mGH	hormônio de crescimento murino
GHRH	hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRHR	receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento
h	humano
HEK	células de rim de embrião humano
HV	alta voltagem - “high voltage”
<sup>125</sup> I	Iodo-125
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina-I
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
kb	Kilobases
<i>lit/lit</i>	camundongos anões
<i>lit/scid</i>	camundongos anões e imunodeficientes
LV	baixa voltagem - “low voltage”
MC	minicírculos
m	murino

mg	miligramas
ms	milisegundos
ng	nanogramas
p	plasmídeo
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmidial
PEG	polietilenoglicol
pMC	plasmídeo parental de minicírculos
RIA	radioimunoensaio
rpm	rotações por minuto
s	segundos
Ubi-C	promotor da Ubiquitina C
V	Volts
µg	microgramas
µL	microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 Hormônio de crescimento humano.....	13
1.2 Fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-I) .....	14
1.3 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH) .....	15
1.3.1 Tratamento para a DGH.....	16
1.4 Terapia gênica.....	17
1.5 Injeção direta de DNA plasmidial .....	20
1.6 Eletroporação.....	21
1.7 Minicírculos de DNA para administração direta, seguida de eletroporação.....	23
1.8 Experiência do nosso grupo .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. MATERIAL</b> .....	<b>28</b>
4.1 Equipamentos e acessórios principais .....	28
4.2 Principais reagentes para biologia molecular .....	29
4.3 Materiais utilizados na administração direta de DNA plasmidial seguida de eletroporação	30
4.3.1 Plasmídeo para injeção direta de DNA plasmidial.....	31
4.3.2 Animais utilizados para a injeção direta de DNA plasmidial .....	31
4.4 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaio e determinação de anticorpos.....	32
4.5 Principal reagente utilizado na dosagem de mIGF-I .....	33
4.6 Principal reagente utilizado na dosagem de glicose .....	33
4.7 Principais materiais e reagentes para cultura celular .....	33
<b>5. MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 Preparo do plasmídeo de DNA (hGH-DNA) .....	34
5.2 Camundongos utilizados e sua manutenção.....	34

<b>5.3 Administração <i>in vivo</i> de DNA plasmidial seguida de eletroporação .....</b>	<b>35</b>
5.3.1 Padronização da quantidade de DNA.....	35
5.3.2 Padronização da voltagem de eletrotransferência .....	35
5.3.3 Administrações <i>in vivo</i> de hGH-DNA, seguidas de eletroporação.....	35
5.3.4 Bioensaio de longa duração (6 meses) .....	35
5.3.5 Bioensaio com camundongos de 60 e 80 dias .....	36
5.3.6 Bioensaio com camundongos de 40 dias .....	36
5.3.7 Ensaio de administração de DNA plasmidial, seguida de diferentes parâmetros de eletroporação, em diferentes músculos.....	37
5.3.8 Administração de hGH-DNA no músculo tibial anterior de camundongos de 40 e 80 dias .....	37
<b>5.4 Obtenção de sangue e determinação das medidas de comprimento e pesagem de órgãos .</b>	<b>38</b>
<b>5.5 Radioimunoensaio (RIA) para quantificação de hGH .....</b>	<b>38</b>
<b>5.6 Dosagem de mIGF-I.....</b>	<b>39</b>
<b>5.7 Dosagem de glicose.....</b>	<b>39</b>
<b>5.8 Determinação de anticorpos anti-hGH no soro dos camundongos .....</b>	<b>39</b>
<b>5.9 ELISA para determinação de mGH.....</b>	<b>40</b>
<b>5.10 Cálculo da porcentagem de recuperação de crescimento (<i>catch-up growth</i>).....</b>	<b>40</b>
<b>5.11 Clonagem dos plasmídeos parentais e produção de MC de DNA.....</b>	<b>41</b>
5.11.1 Plasmídeos parentais de minicírculos de hGH e mGH com o promotor do CMV .....	41
5.11.2 Plasmídeos parentais de minicírculos de hGH e mGH com o promotor da Ubi C .....	41
5.11.3 Produção de minicírculos de hGH e mGH.....	42
5.11.4 Transfecção de células HEK 293 com os plasmídeos parentais e minicírculos.....	42
<b>5.12 Análise estatística .....</b>	<b>43</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>6.1 Padronização da quantidade de DNA plasmidial administrada em camundongos lit/scid ..</b>	<b>44</b>
<b>6.2 Padronização da voltagem em camundongos lit/scid .....</b>	<b>45</b>
<b>6.3 Bioensaio de longa duração (6 meses) .....</b>	<b>45</b>
6.3.1 Determinação de hGH.....	52
6.3.2 Determinação de mIGF-I.....	52
6.3.3 Dosagem de glicose .....	53
6.3.4 Determinação de anticorpos anti-hGH.....	54
<b>6.4 Relação entre diferentes quantidades de DNA plasmidial e secreção de mIGF-I.....</b>	<b>55</b>

<b>6.5 Avaliação dos parâmetros de crescimento após a administração de DNA plasmidial em camundongos de diferentes idades</b> .....	<b>56</b>
<b>6.6 Administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH no músculo de camundongos lit/scid de 40 dias</b>	<b>60</b>
<b>6.7 Ensaio de administração de DNA plasmidial, seguida de diferentes parâmetros de eletroporação, em diferentes músculos (quadríceps ou tibial anterior)</b> .....	<b>62</b>
<b>6.8 Ensaio de administração de DNA plasmidial no músculo tibial anterior direito e esquerdo, seguida de eletroporação</b> .....	<b>64</b>
<b>6.9 Clonagem e produção de minicírculos</b> .....	<b>70</b>
6.9.1 Clonagem do plasmídeo pMC-CMV-hGH.....	70
6.9.1.1 Produção de minicírculos MC-CMV-hGH .....	71
6.9.2 Clonagem do plasmídeo pMC-CMV-mGH.....	71
6.9.2.2 Produção de minicírculos MC-CMV-mGH .....	72
6.9.3 Alteração do promotor CMV pelo Ubi C nos plasmídeos parentais de MC .....	73
6.9.4 Transfecção nas células HEK 293 com os minicírculos de DNA.....	75
6.9.4.1 Transfecção de células HEK 293 com os plasmídeos convencionais e MC contendo o gene do hGH.....	75
6.9.4.2 Transfecção de células HEK 293 com o pMC-CMV-mGH e MC-CMV-mGH.....	75
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hormônio de crescimento humano

O hormônio de crescimento humano (hGH ou somatotropina) é um polipeptídeo de cadeia única, possui 191 aminoácidos e uma massa molecular de 22 kDa. É sintetizado, armazenado e secretado pelas células somatotróficas da lateral esquerda da glândula pituitária anterior, que geralmente contém entre 3-5 mg de GH e secreta entre 0,5 e 0,875 mg da proteína por dia. Apesar disto, os níveis circulantes de GH no plasma são baixos, em razão da curta meia vida circulatória (20-30 min). Além disso, a liberação do hormônio ocorre de maneira pulsátil e geralmente são de 4-8 picos diários (Cázares-Delgadillo et al., 2011).

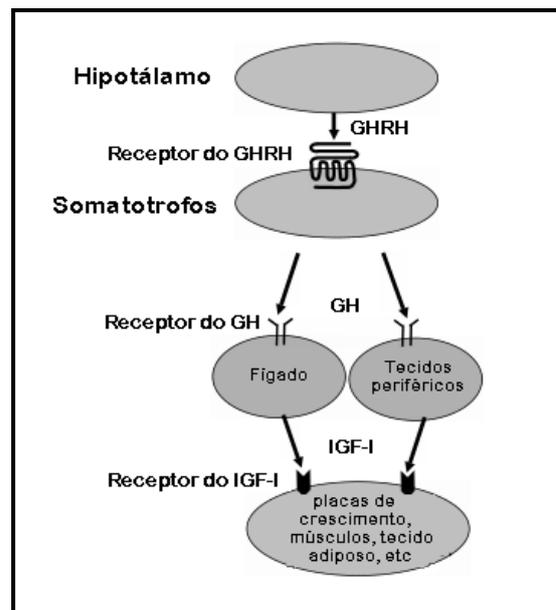
Em humanos, a liberação do GH é sexualmente dimórfica, na qual as mulheres apresentam uma maior quantidade de pulsos diários em relação aos homens, porém de menores amplitudes (Cázares-Delgadillo et al., 2011).

Na infância os níveis basais de GH são baixos e aumentam conforme a idade, atingindo os maiores níveis durante a adolescência, e a secreção vai diminuindo de maneira gradativa e progressiva após a terceira década de vida (Cázares-Delgadillo et al., 2011).

O sistema de secreção do hGH é modulado por um complexo controle neuroendócrino, incluindo dois principais reguladores de origem hipotalâmica: o hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e a somatostatina. Estes dois hormônios são secretados em vias independentes e interagem com os secretagogos adicionais do GH, gerando uma liberação pulsátil deste hormônio. O GHRH induz a liberação e regula a magnitude dos pulsos de GH e a somatostatina determina a frequência e a duração destes (Melmed et al., 2011; Goldman et al., 2011).

Apesar destes dois reguladores serem os principais determinantes na liberação/inibição do GH, outros fatores fisiológicos podem interferir e alterar a secreção, por exemplo a grelina, o estradiol e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) (Cázares-Delgadillo et al., 2011).

O GH pode atuar no crescimento e no metabolismo de maneira direta, aumentando a absorção de aminoácidos e também a síntese proteica em músculos ou outros tecidos. Atua também de maneira indireta mediado por outros hormônios. Destes o mais importante é o IGF-I, que é o principal mediador do GH no crescimento (Fig.1) (Cázares-Delgadillo et al., 2011).



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

## 1.2 Fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-I)

O GH e o IGF-I são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento nos estágios embrionários e pós-natal, principalmente na puberdade. O IGF-I é produzido principalmente no fígado, quando o GH se liga aos seus receptores neste órgão, estimulando a expressão do gene do IGF-I e a sua liberação para a corrente sanguínea, quando então poderá atuar no crescimento estimulando a divisão e

multiplicação de condrócitos e osteoblastos, que são as células primárias na epífise dos ossos longos (Yakar et al., 2000; Le Roith, 2003, Cázares-Delgadillo et al., 2011).

O IGF-I é um polipeptídeo de aproximadamente 7 kDa e é responsável pela maioria das atividades promovidas pelo GH no crescimento, 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; e quando em concentrações elevadas estimula a liberação de somatostatina, conseqüentemente inibindo a secreção do GH na hipófise anterior. Quando há alterações nos níveis de GH, a liberação de IGF-I também é afetada (Donahue et al., 1993; Melmed et al., 2011; Klover ; Henninghausen, 2007).

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).

### **1.3 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH)**

O GH é o principal fator regulatório do crescimento corporal, e sua deficiência é a mais comum dentre os hormônios de origem pituitária. Pode ter origem congênita, adquirida ou na maioria dos casos, idiopática. Níveis anormais de GH podem afetar não somente o crescimento, como também o metabolismo, funções imune e cardíaca, agilidade mental entre outros (Lanning; Carter-Su, 2007; Alatzoglou; Dattani, 2010).

Fatores genéticos, como mutações, estão cada vez mais relacionados à etiologia da deficiência de GH em casos esporádicos. Podem estar relacionadas ao gene do hormônio de crescimento (GH1), do receptor do hormônio liberador de GH (GHRHR), ou mais raramente a mutações em outras vias, como por exemplo SOX3 (Alatzoglou; Dattani, 2010).

A DGH é uma condição crônica que necessita de reposição de GH por um longo período da vida e os principais objetivos são a normalização do crescimento durante a infância, até atingir o tamanho normal de um indivíduo na idade adulta,

além de garantir uma melhor qualidade de vida para esses indivíduos (Rocha et al., 2008; Kemp, 2010; Molitch, 2011; Bank et al., 2012; Cook; Rose, 2012).

### 1.3.1 Tratamento para a DGH

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 em doses insuficientes, com a sua suspensão após a fusão das cartilagens de crescimento. A utilização de GH pituitário foi suspenso em 1985, quando quatro pacientes tratados na década de 1960 com este tipo de terapia foram diagnosticados com a doença de Creutzfeldt-Jacob, aparentemente resultados de hGH pituitário contaminado por *prions* (Soondergaard et al., 2003; Portes; Barbosa, 2008; Kemp, 2010; Cázares-Delgadillo et al., 2011; Blizzard, 2012).

O GH recombinante foi produzido pela primeira vez em bactérias *E. coli* em 1985, e em 1987, em células murinas. Assim, o tratamento com GH pituitário foi rapidamente substituído pelo recombinante (Cázares-Delgadillo et al., 2011). Houve portanto um avanço significativo no tratamento da DGH, uma vez que se tornou possível sintetizar grandes quantidades do hormônio puro, aumentando sua disponibilidade, tornando possível o tratamento de crianças com diagnóstico de baixa estatura sem critérios clássicos de DGH, visando evitar o retardo no crescimento e também em adultos com diagnósticos de deficiência deste hormônio (Soondergaard et al., 2003; Portes; Barbosa, 2008; Kemp, 2010).

Entretanto, a administração do hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH) apresenta algumas desvantagens, como os dispendiosos processos de purificação, o que eleva os custos do tratamento. Devido ao rápido *clearance in vivo*, há a necessidade de injeções diárias, durante vários anos de acordo com as características e severidade da DGH (Bellini et al., 2003; Soondergaard et al., 2003; Peroni et al., 2005; Alatzoglou; Dattani, 2010; Oliveira et al., 2010; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

O tratamento ideal para a DGH seria aquele em que estes tipos de inconvenientes fossem evitados e principalmente, que o processo de liberação do GH fosse sustentável, por um longo período e com a possibilidade de alterações de acordo com as mudanças no metabolismo, além da obtenção de níveis normais e

sustentáveis de IGF-I (Bellini et al., 2003; Soondergaard et al., 2003; Peroni et al., 2005; Oliveira et al., 2010; Alatzoglou; Dattani, 2010; Cázares-Delgadillo et al., 2011; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

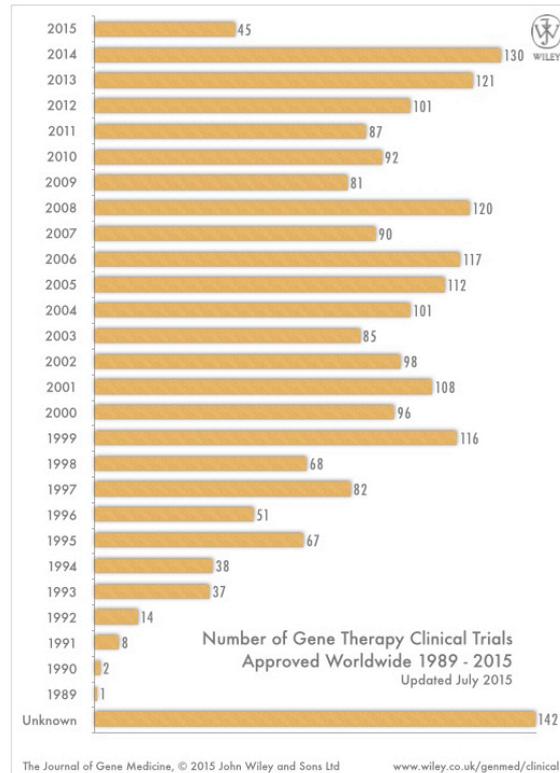
Uma potencial alternativa ao tratamento padrão, que tem sido alvo de vários estudos para diversas doenças, é a terapia gênica (Soondergaard et al., 2003; Peroni et al., 2005; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

#### **1.4 Terapia gênica**

A terapia gênica pode ser definida como a introdução de genes funcionais nas células ou tecidos, com a finalidade de gerar um efeito terapêutico, e conseqüentemente tratar, corrigir ou prevenir um processo patológico no paciente (Kay, 2011; Huang-Su et al., 2012; Nayerossadat et al., 2012; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

A terapia gênica é considerada promissora para o tratamento de diversos tipos de doenças. Embora inicialmente o principal foco tenham sido as doenças genéticas hereditárias ligadas a um único gene (ex: imunodeficiência combinada grave, ou SCID). Atualmente diversas doenças com diferentes padrões de heranças genéticas, relacionadas a alterações em um único ou em múltiplos genes, ou as adquiridas são alvos deste tipo de terapia (Huang-Su et al., 2012; Nayerossadat et al., 2012; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

Dentre os mais de 2000 protocolos clínicos aprovados desde 1989 para a terapia gênica (Fig. 2), os mais comuns são destinados aos tipos de cânceres (64,2%), doenças monogênicas (9,2%), infecciosas (8%) e cardiovasculares (7,8%). A maioria destes protocolos estão na fase I, onde são realizados testes do tratamento em um pequeno grupo de indivíduos e avaliados a segurança, a dosagem e os efeitos adversos (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2015; Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials, 2015).



**Fig. 2.** Número anual de protocolos clínicos de terapia gênica aprovados mundialmente desde 1989 (Applied Clinical Trials)

A terapia gênica pode ser dividida em duas categorias: germinativa e somática. Na primeira abordagem são modificadas as células germinativas antes da fecundação, visando não somente a cura do indivíduo tratado, mas também garantindo uma modificação genética hereditária e, apesar do grande potencial, atualmente este tipo de terapia é proibido em virtude de questões éticas (Nayerossadat et al., 2012).

A terapia gênica humana permitida para aplicação em humanos é a terapia somática, que apresenta um grande avanço na área desde 1989 e que envolve a inserção de genes funcionais, mediante a utilização de um vetor, em células diploides de um indivíduo. Este tipo de terapia é considerada mais conservativa e segura, uma vez que corrige somente as células de interesse no paciente, sem transferir para as futuras gerações, sendo considerada apropriada e aceitável para diversas doenças (Nayerossadat et al., 2012).

A terapia gênica somática basicamente inicia-se com a identificação do gene alterado, responsável pela causa da doença, e então a clonagem de um gene idêntico ao normal (gene terapêutico ou transgene) em um vetor e a inserção deste vetor terapêutico no paciente. Uma das limitações na obtenção do sucesso da terapia gênica é a escolha do vetor. (Ramamoorth; Narverkar, 2015).

Vetores são os veículos responsáveis por transferir o gene terapêutico de interesse em uma ampla variedade de células, tecidos e órgãos, e conseqüentemente devem ter potencial para atingir o núcleo da célula, onde o transgene será traduzido na proteína/enzima de interesse. (Ramamoorth; Narverkar, 2015).

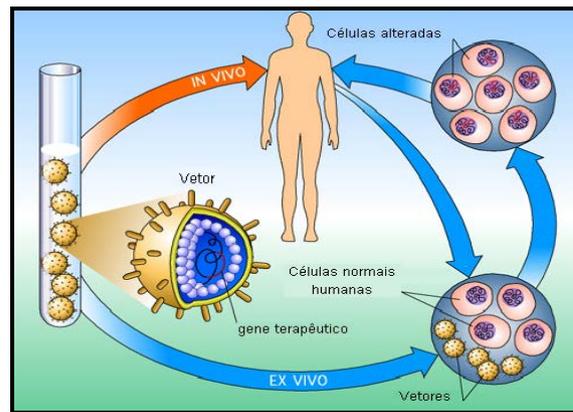
A escolha do vetor ideal depende da especificidade em relação às células-alvo, deve ser capaz de ser produzido em grandes quantidades, possuir resistência à degradação metabólica, baixa ou nula imunotoxicidade, habilidade para expressão do transgene a longo prazo, além disso, seria bastante interessante, em muitos casos, possuir um mecanismo para regular a expressão do transgene afim de obter o efeito terapêutico desejado (Prud'homme et al., 2006; Kaji; Leiden, 2001; Ramamoorth; Narverkar, 2015)

Os vetores utilizados na terapia gênica podem ser de origem viral ou não viral. A eficiência de transfecção das células é relativamente maior quando utilizados vetores virais comparados aos não virais, porém devido a uma variedade de problemas como imunogenicidade, citotoxicidade e potencial inserção mutagênica (ex. integração cromossômica do DNA viral e potencial ativação de um oncogene) relacionados a esse tipo de vetor, além da limitação no tamanho do gene de interesse, a utilização de vetores não-virais é considerada uma alternativa viável para a transferência do transgene (Braun, 2008; Huang-Su et al., 2012; Nayerossadat et al., 2012; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

A inserção do vetor contendo o gene terapêutico no paciente/indivíduo pode ser mediante dois tipos de abordagens: *ex vivo* e *in vivo* (Fig. 3). Na primeira, células são retiradas de um paciente ou doador, cultivadas, modificadas com o transgene e selecionadas *in vitro* para posteriormente serem (re) implantadas. Uma das

desvantagens deste tipo de terapia é que apenas uma pequena porcentagem das células (re) implantadas permanecem viáveis (Nayerossadat et al., 2012).

Na administração *in vivo* do transgene, o material genético é transferido diretamente nas células alvo, mediante a utilização de um vetor de origem viral ou não-viral. 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. (Nayerossadat et al., 2012).



**Fig. 3:** Representação das metodologias de transferência gênica (Proyecto Biosfera-modificado)

Um dos métodos de transferência gênica utilizando vetores de origem não-viral mais utilizado atualmente é a injeção direta de DNA plasmidial ou *naked DNA*, que consiste em um plasmídeo comumente passível de replicação em sistemas bacterianos e que contém um gene de interesse sob o controle de vários elementos regulatórios.

### 1.5 Injeção direta de DNA plasmidial

A injeção direta de DNA plasmidial ou *naked DNA* utiliza vetores de origem não-viral diretamente no tecido/órgão, e embora a utilização na terapia gênica deste tipo de vetor tenha sido ignorada durante muitos anos devido à baixa eficiência de transfecção e expressão transiente, o número de protocolos clínicos aumentou

expressivamente a partir de 2004, devido à baixa imunotoxicidade, capacidade de transferir transgenes de vários tamanhos (2 a 19 kb), facilidade de produção e baixo custo (Nayerossadat et al., 2012; Ramamoorth & Narverkar, 2015).

É um método simples e prático, que 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 menor “*turnover*” das fibras musculares, o que permite uma expressão a longo prazo (Bigey et al., 2002; Fattori et al., 2002; Schmidt-Wolf; Schmidt-Wolf, 2003; Bloquel et al., 2004; Ratanamart; Shaw, 2006).

Um dos grandes desafios para viabilizar a utilização da terapia gênica *in vivo* no músculo é a obtenção de níveis elevados e prolongados da proteína transgênica, uma vez que o potencial de utilização desta técnica para aplicação em humanos é limitado pela baixa eficiência e alta variabilidade de expressão (Bloquel et al., 2004; Ratanamart; Shaw, 2006).

Para aumentar a eficiência da injeção direta de DNA plasmidial, diferentes estratégias utilizando métodos físicos têm sido utilizadas em conjunto para facilitar a entrada do DNA plasmidial nas células-alvo e uma das mais promissoras é a eletroporação (Ratanamart; Shaw, 2005; Ramamoorth; Narverkar, 2015).

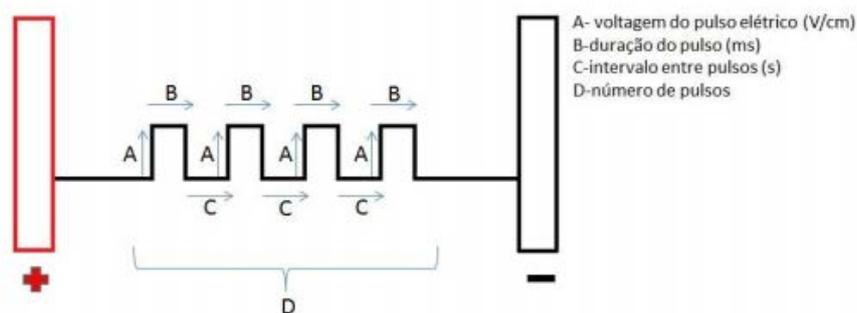
## **1.6 Eletroporação**

A eletroporação ou transferência elétrica do transgene causa uma desestabilização temporária da membrana celular-alvo, mediante a aplicação de pulsos elétricos, curtos e controlados, acima de um limiar de capacidade da membrana, resultando em uma diferença de potencial transmembrana em um ponto específico, conseqüentemente formando poros transientes que vão permitir a

passagem do DNA plasmidial no citoplasma das células (Ramamoorth; Narverkar, 2015).

É uma técnica segura, fácil de ser aplicada, possui um baixo custo, é considerada como 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 et al., 2004; Ratanamart; Shaw, 2006; Miyazaki; Miyazaki, 2008).

Esta técnica pode ser utilizada em conjunto com a injeção direta de DNA plasmidial em diversos locais: intradérmico, intramuscular ou intratumoral. A formação dos poros depende da duração do pulso e da corrente elétrica utilizada em cada tecido-alvo. Geralmente as células de câncer são permeáveis em uma baixa voltagem e um longo pulso, enquanto os músculos necessitam de um pulso de curta duração e uma maior voltagem. Na Fig. 4 está representado um esquema de eletroporação do tipo onda quadrada (Nayerossadat et al., 2012; Ramamoorth; Narverkar, 2015).



**Fig. 4:** Esquema da magnitude dos pulsos utilizando eletroporação do tipo onda quadrada (Cecchi, C. R., 2013).

A partir dos poros formados, o DNA plasmidial é alvo de um efeito eletroforético, que promove a migração e entrada desse material genético no interior das células. Em condições otimizadas dos parâmetros para a eletrotransferência, é possível obter excelentes níveis de permeabilização e sobrevivência celular (Mir et al., 1999; Fattori et al., 2002; Bloquel et al., 2004; Ratanamart; Shaw, 2006).

Dentre os diversos tecidos-alvo, o músculo é o mais utilizado, uma vez que é capaz de produzir uma grande quantidade do produto transgênico e pode atuar semelhantemente a um órgão endócrino. Porém contém algumas “barreiras”, como por exemplo a matriz extracelular, que pode ser responsável pela baixa eficiência de transferência do transgene no músculo (aproximadamente 1% das fibras) (Gollins et al., 2003; Hojman et al., 2007).

O pré-tratamento do músculo esquelético com hialuronidase bovina, antes da administração do DNA plasmidial, seguida de eletroporação, pode melhorar significativamente a eficiência da transfecção em relação ao não-tratamento. Além disso, o uso da hialuronidase pode diminuir o dano associado com a eletrotransferência em músculos não-distróficos. O aumento da eficiência pode ser resultado de uma permeabilização da matriz extracelular e consequente aumento na acessibilidade da superfície das fibras musculares pelo DNA plasmidial (Gollins et al., 2003).

A administração direta de um plasmídeo, seguida de eletroporação, tem demonstrado sua eficiência e potencial aplicação no tratamento de diferentes doenças sistêmicas como hemofilia, anemia crônica, diabetes mellitus, deficiência de hormônios peptídicos e em infecções da mucosa intestinal (Fattori et al., 2002; Ratanamart; Shaw., 2006; Prud’homme et al., 2007; Bodles-Brakhop et al., 2009; Gothelf; Gehl., 2010 Shoji et al., 2012).

### **1.7 Minicírculos de DNA para administração direta, seguida de eletroporação**

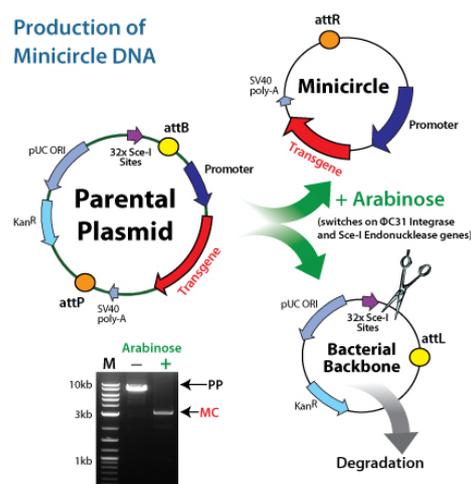
A dificuldade de expressar níveis sustentáveis da proteína de interesse, quando utilizados plasmídeos convencionais de DNA (pDNA) na terapia gênica, pode estar relacionada a um silenciamento do cassete de expressão do gene. O mecanismo pelo qual isto pode ocorrer é uma deposição de heterocromatina repressiva induzida pelo *backbone* bacteriano, o que consequentemente pode iniciar

uma ativação da resposta imune e consequente morte das células transfectadas por inflamação (Osborn et al., 2010; Kay et al., 2010).

O *backbone* bacteriano corresponde a sequências necessárias para a preparação e amplificação em bactérias, como a origem de replicação e o gene de resistência a antibióticos, porém não são importantes para a expressão gênica *in vivo*. A deleção de sequências desnecessárias é recomendada para diminuir o tamanho da molécula, facilitando a manipulação e consequentemente aumentar a eficiência de transfecção do transgene (Keeney et al., 2013).

Um novo sistema de expressão circular ausente do *backbone* bacteriano e que tem sido utilizado em estudos de transferência gênica com bastante eficiência são os minicírculos (MC). São diferentes dos plasmídeos convencionais, uma vez que possuem somente o cassete de expressão, que consiste no gene de interesse e sequências regulatórias necessárias para a expressão em células de mamíferos (Gill et al., 2009; Chabot et al., 2013; Keeney et al., 2013).

Para a produção de MC de DNA, é necessária a construção prévia de um plasmídeo parental de MC, que possui as mesmas sequências específicas para a amplificação de um plasmídeo convencional em bactérias, além de dois sítios específicos *attB* e *attP* que irão se unir após a indução por *L-arabinose*, criando dois vetores fechados, o MC com o gene de interesse e o *backbone bacteriano*.



**Fig. 5:** Esquema da produção de minicírculos de DNA (Uniscience).

Estudos recentes têm demonstrado que os MC são mais eficientes e mais estáveis na expressão do transgene em diversas linhagens celulares, e podem ser de 2 a 15 vezes mais eficientes que os pDNA (Chabot et al., 2013; Gaspar et al., 2015).

Na tentativa de aumentar a expressão dos genes do hGH e mGH *in vivo*, foi realizada a clonagem destes genes em plasmídeos parentais de MC, utilizando os promotores do CMV e da Ubi C e a respectiva produção de MC, na Universidade de Aarhus-Dinamarca, durante um estágio financiado pela FAPESP. O propósito é a administração destes MC em modelos animais para a DGH, os camundongos anões *lit/lit* e *lit/scid*, utilizando o protocolo de eletroporação padronizado em nosso laboratório.

### **1.8 Experiência do nosso grupo**

O nosso grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia do IPEN tem estudado uma alternativa ao tratamento atual para a DGH, utilizando a administração *in vivo* de plasmídeos contendo o gene do hormônio de crescimento humano (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Higuti et al., 2016) e murino (Cecchi et al., 2014), seguida de eletroporação, nos músculos quadríceps e tibial anterior de camundongos *lit/scid* e *lit/lit*.

Com a utilização desta metodologia de transferência gênica para a DGH, foi possível a obtenção de níveis sustentáveis de hGH na circulação de camundongos *lit/scid* durante 60 dias, além de um aumento significativo dos parâmetros de crescimento analisados (peso corpóreo, comprimento total do corpo, dos fêmures, da cauda, e dos níveis de mIGF-I).

Quando comparada este tipo de estratégia de terapia gênica para a DGH com a administração diária do hormônio de crescimento recombinante (r-hGH), durante 28 dias, em camundongos anões e imunodeficientes (Higuti et al., 2012), os resultados foram bastante promissores, sendo considerada viável este tipo de estratégia proposta para o tratamento da DGH.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Ressaltamos que não há relatos na literatura deste tipo de correção fenotípica completa para o nanismo, utilizando uma estratégia de terapia gênica que associa a administração de um vetor não-viral à eletrotransferência, em camundongos anões.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Realizar um tratamento terapêutico mediante a administração de DNA plasmidial (pDNA), contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH – DNA), seguida de eletroporação, que possa levar à correção fenotípica do nanismo, avaliada por diferentes parâmetros de crescimento.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Otimizar a administração do DNA plasmidial quanto ao músculo utilizado e a quantidade de hGH-DNA, além dos parâmetros de eletroporação (voltagem, número e intervalo dos pulsos), visando aumentar a expressão do hGH.
- Avaliar os parâmetros de crescimento (peso corpóreo, comprimento total do corpo, da cauda e dos fêmures) dos camundongos após a administração do hGH – DNA, seguida de eletroporação, e comparar com os mesmos parâmetros dos animais injetados com salina e eletroporados (controle negativo) e com os dos camundongos *Scid* (controle positivo).
- Determinar os níveis de mIGF-I e hGH no plasma dos camundongos tratados e controles.
- Construir minicírculos de DNA com os promotores do CMV e da Ubiquitina C, ambos contendo os cDNAs do hormônio de crescimento humano e murino e comparar a expressão *in vitro* e *in vivo* destes com plasmídeos convencionais contendo estes genes, visando aumentar a incorporação do DNA transgene nas células e sua expressão *in vivo*.

## 4. MATERIAL

### 4.1 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);
- ✓ Banho-maria, modelo 146, FANEN (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Câmara de Neubauer - BOECO (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B – SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada automática, modelo 5810R, EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Contador gama automático 2470 Wizard 2, PERKIN ELMER (Waltham, Massachusetts, EUA);
- ✓ Destilador de água, modelo 016, FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Estufa de cultura celular, modelo 3159 - FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Espectrofotômetro, modelo Ultraspec 2100 pro, AMERSHAM BIOSCIENCES (Uppsala, Suécia);
- ✓ Fluxo Laminar Classe II A/B 3, modelo 1140, FORMA SCIENTIFIC (Marietta, Ohio, EUA);
- ✓ Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR IMAGE SYSTEMS (Jerusalém, Israel);

- ✓ Fonte de alta tensão para eletroforese, ECPS 3000/150, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- ✓ Fonte de alta tensão para eletroforese, EPS 600, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- ✓ Fluxo laminar classe II A/B 3, modelo 1140 - FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Freezer -20° C, modelo 0651 – PROSDÓCIMO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Freezer -40° C, modelo AB 240 – METALFRIO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Freezer -80° C, modelo 8425 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH, (Bethesda, EUA);
- ✓ Microcentrífuga, modelo 5415P - EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Microscópio invertido, modelo ID 03 - CARL ZEISS (Oberkochen, Alemanha);
- ✓ Micropipetas LABMATE SOFT Monocanal de volume variável: 10µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL- HTL (Varsóvia, Polônia);
- ✓ Nanodrop - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- ✓ Placas de microtitulação com fundo em “U” - DYNATECH (Chantilly, EUA);
- ✓ Ponteiros sem filtro, volumes de 10 a 1000 µL – AXYGEN (Union, EUA);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q plus – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- ✓ Termociclador Veriti 96 poços - APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City, CA, EUA);
- ✓ Tubos de poliestireno para imunoenaios (7,5 x 1,2 cm) - EMTEL (São Paulo, Brasil).

## **4.2 Principais reagentes para biologia molecular**

- ✓ Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Bactérias competentes XL-1 blue-STRATAGENE/AGILENT TECHNOLOGIES (Santa Clara, CA, EUA);

- ✓ Bactérias competentes XL-2 blue-STRATAGENE/AGILENT TECHNOLOGIES (Santa Clara, CA, EUA);
- ✓ Bactérias competentes da linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$  - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- ✓ Bactérias competentes da linhagem ZYCY10P35S2T/ZY77 (Dr. Jacob Giehm Mikkelsen, UNIVERSIDADE DE AARHUS (Aarhus, Dinamarca);
- ✓ Brometo de etídio – LKB – PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- ✓ Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- ✓ Enzima fosfatase alcalina (CIP) - NEW ENGLAND BIOLABS INC. (Ipswich, MA, EUA);
- ✓ Enzima *Herculase II Fusion*- AGILENT TECHNOLOGIES, (La Jolla, CA, EUA);
- ✓ Enzima T4 Ligase HC - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- ✓ Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Marcador de peso molecular de 100 pb e 1 kb Gene Ruler<sup>TM</sup> – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- ✓ Sistema para purificação de DNA miniprep E.Z.N.A - OMEGA BIO-TEK (Norcross, GA, EUA);
- ✓ Sistema para purificação de DNA Xtra Midi/Maxi - NUCLEOBOND - MARCHNEREY-NAGEL (Düren, Alemanha);
- ✓ Sistema para extração de DNA de gel de agarose E.Z.N.A - OMEGA BIO-TEK (Norcross, GA, EUA);
- ✓ Triptona - Bacto<sup>TM</sup> Tryptone – BECTON DICKINSON (Sparks, MD, EUA).

#### **4.3 Materiais utilizados na administração direta de DNA plasmidial seguida de eletroporação**

- ✓ Eletroporador ECM-830 - BTX (Holliston, MA, EUA);
- ✓ Eletrodo do tipo paquímetro, utilizando uma distância de 3 mm entre as placas de 1,0 x 1,0 cm - BTX (Holliston, MA, EUA);
- ✓ 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);
- ✓ Máquina de corte elétrico para barba - GAMA ITALY (Bolonha, Itália);
- ✓ Paquímetro digital -MITUTOYO (Suzano, SP, 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).

#### **4.3.1 Plasmídeo para injeção direta de DNA plasmidial**

- ✓ 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. Thomas. G. Jensen (Universidade de Aarhus, Dinamarca).

#### **4.3.2 Animais utilizados para a injeção direta de DNA plasmidial**

- ✓ 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 Prkdc, 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 CBySmn.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>, conhecidos como Scid, que possuem a mesma imunodeficiência dos camundongos

lit/scid, porém sem a mutação que origina o nanismo. Foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (São Paulo, SP).

#### **4.4 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaio e determinação de anticorpos**

- ✓ Anticorpo policlonal anti-hGH, NIDDK - anti hGH-2, fornecido pelo Dr. A. F. Parlow - NATIONAL HORMONE AND PITUITARY PROGRAM (NHPP, Torrance, CA, EUA);
- ✓ Azida sódica - SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Controles de qualidade para imunoenaios baseados em sangue humano, Lyphochek I Imunnoassay Plus Control (níveis 1, 2 e 3) - BIORAD - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Cloramina T p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Fosfato de sódio bibásico p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Fosfato de sódio monobásico p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Metabissulfito de sódio - CARLO ERBA (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓  $^{125}\text{I}$  comercial, livre de carreadores e oxidantes, com atividade específica de 11.100-22.200 MBq/mL (300-600 mCi/mL) - NORDION EUROPE S.A. (Fleurus, Bélgica);
- ✓ Polietilenoglicol-PEG 6000 - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Preparação de hGH recombinante altamente purificado para iodinação - IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil) (Ribela et al., 1993; Oliveira et al., 1999);
- ✓ Resina cromatográfica Sephadex G100 - GE HEALTHCARE BIOSCIENCES (Piscataway, NJ, EUA);
- ✓ Segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro - IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Soro albumina bovina (BSA), RIA grade (fração V) - SIGMA (St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Soro de coelho normal - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Soro humano (coleta voluntária de indivíduos saudáveis);
- ✓ Tween-20 - SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

#### 4.5 Principal reagente utilizado na dosagem de mIGF-I

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

#### 4.6 Principal reagente utilizado na dosagem de glicose

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

#### 4.7 Principais materiais e reagentes para cultura celular

- ✓ Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - LABSYNTH (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Dimetilssulfóxido (DMSO) - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Garrafas de 75 cm<sup>2</sup> - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- ✓ Lipofectamine 2000/well INVITROGEN - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- ✓ Meio DMEM *high glucose* - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Penicilina-estreptomicina - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Pipetas de 1,2,5,10 e 25 ml - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- ✓ Placas de 24 poços - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- ✓ Sistemas de filtração de 500 mL, porosidade de 0,22 µm - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- ✓ Soro fetal bovino (SFB) - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Tripsina - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Tubos para centrifuga de 15 e 50 mL - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA).

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Preparo do plasmídeo de DNA (hGH-DNA)

Bactérias competentes da linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$ , transformadas com o plasmídeo pUC-UBI-hGH, foram amplificadas *overnight* em meio LB com ampicilina e o DNA plasmidial foi extraído e purificado, utilizando um sistema comercial de Midi/Maxi prep, de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação do plasmídeo purificado foi realizada por leitura espectrofométrica em aparelho Nanodrop. A presença do inserto correspondente à sequência genômica do hGH foi confirmada por análise de restrição, utilizando as enzimas *Bam HI* e *Eco RI*.

### 5.2 Camundongos utilizados e sua manutenção

Os grupos de camundongos *lit/scid* e *Scid* utilizados foram compostos por machos e fêmeas na mesma proporção, com idade entre 40 e 80 dias no início dos experimentos. Por possuírem uma imunodeficiência severa, foram mantidos em microisoladores, dentro de uma área de criação controlada do Biotério do IPEN/CNEN-SP e todos os materiais utilizados para a manutenção foram previamente esterilizados. Foram mantidos nas seguintes condições de criação:

- ✓ Temperatura ambiente:  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ;
- ✓ Iluminação artificial com ciclo circadiano de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- ✓ Ração e água ad libitum.

A utilização destes animais neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN, Projeto nº 11 parecer de 27 de outubro de 2006 e Projeto nº 145/14 de 05 de setembro de 2015.

### **5.3 Administração *in vivo* de DNA plasmidial seguida de eletroporação**

#### **5.3.1 Padronização da quantidade de DNA**

Para a padronização da quantidade de DNA, foram administrados 25, 50 e 75 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguidos de eletroporação, utilizando os parâmetros padronizados por Oliveira et al. (2010): 8 pulsos de 90 V/cm e 20 ms com 0,5 s de intervalo.

#### **5.3.2 Padronização da voltagem de eletrotransferência**

Para a padronização da voltagem, após a administração de 50 µg de hGH-DNA ou solução salina, foram aplicados 60, 90, 120 ou 150 V/cm/animal.

#### **5.3.3 Administrações *in vivo* de hGH-DNA, seguidas de eletroporação**

Para as padronizações mencionadas acima, os camundongos *lit/scid* foram previamente anestesiados com uma mistura de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. Os pêlos da região do quadríceps direito foram retirados e o músculo exposto, onde foi injetada a enzima hialuronidase (20 U/50 µL). Após 30 minutos, foram injetadas diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-hGH diluído em 50 µL de solução salina/animal, e em seguida foi realizada a eletroporação no músculo utilizando os parâmetros previamente padronizados (8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo), com variação da voltagem.

#### **5.3.4 Bioensaio de longa duração (6 meses)**

Antes dos ensaios de administração de DNA plasmidial em camundongos *lit/scid*, foi realizado um pré-ensaio de 10 dias, onde os camundongos foram pesados e aqueles que apresentaram uma variação de  $\pm 3\%$  do peso corpóreo, foram descartados (Bellini; Bartolini, 1993; Bellini et al., 1998).

Os camundongos *lit/scid* foram divididos em grupo controle salina (n=24), grupo tratado com DNA plasmidial (n=26) e um grupo controle com camundongos *Scid* (n=21) sem tratamento, utilizados como parâmetro de crescimento normal (Higuti et al., 2012). Todos os animais utilizados neste experimento nos 3 grupos tinham a mesma idade inicial ( $\pm$  75 dias).

Para a primeira cirurgia após a administração de hialuronidase 20U/50 $\mu$ L, foram injetados 50  $\mu$ g do hGH-DNA/ 50  $\mu$ L solução salina no quadríceps direito; na segunda cirurgia (104<sup>o</sup> dia), a mesma quantidade de plasmídeo, porém no quadríceps esquerdo e para a terceira cirurgia (161<sup>o</sup> dia), foram utilizados 100  $\mu$ g do plasmídeo/50  $\mu$ L salina, novamente no músculo quadríceps esquerdo. Todas as administrações foram seguidas de eletrotransferência utilizando os parâmetros padronizados.

Todos os grupos foram submetidos a pesagens semanais durante o tratamento, para controle da variação de peso corpóreo.

### **5.3.5 Bioensaio com camundongos de 60 e 80 dias**

Neste bioensaio foi realizada uma comparação da administração de hGH-DNA em camundongos *lit/scid* de 60 e 80 dias. Após 30 min da administração de hialuronidase (20U/50 $\mu$ L), foram injetados 50  $\mu$ g/50  $\mu$ L do plasmídeo pUC-UBI-hGH diluído em solução salina, no músculo quadríceps direito exposto, seguido de eletroporação, em diferentes grupos: camundongos de 60 (n=6) ou 80 dias (n=3), um grupo tratado sem a administração prévia da enzima hialuronidase (n=3) e um grupo tratado com a administração bilateral de 50  $\mu$ g/50  $\mu$ L/quadríceps (n=7). Como controle foram administrados 50  $\mu$ L de solução salina em um grupo com a idade inicial de 80 dias (n=7).

Todos os grupos foram submetidos a pesagens durante o tratamento, para controle da variação de peso corpóreo.

### **5.3.6 Bioensaio com camundongos de 40 dias**

Neste bioensaio foi realizada uma administração de hGH-DNA em camundongos *lit/scid* de 40 dias (n=7) no início do tratamento. Para este bioensaio

foram alterados os volumes de injeção da enzima hialuronidase e de solução salina, utilizada para diluir o DNA. Após 30 min da administração de 20 U/20 µL de hialuronidase, foram injetados 50 µg/20 µL de pUC-UBI-hGH ou 20 µL de salina no músculo quadríceps direito exposto, seguida de eletroporação.

Todos os grupos foram submetidos a pesagens durante o tratamento, para controle da variação de peso corpóreo

### **5.3.7 Administração de DNA plasmidial, seguida de diferentes parâmetros de eletroporação, em diferentes músculos**

Neste experimento foi realizada uma comparação da expressão de hGH nos músculo quadríceps exposto ou não, e no músculo tibial anterior não exposto de camundongos de ~80 dias de idade.

A enzima hialuronidase foi administrada em uma quantidade de 20 U/20 µL. Após 30 min. foram injetados 50 µg/20 µL do pDNA ou salina, nos músculos quadríceps direito exposto, seguido de eletroporação com os parâmetros utilizados nos experimentos anteriores. Foi também realizada a administração da mesma quantidade e volume de hGH-DNA no músculo tibial anterior direito não exposto, seguida do seguinte parâmetro de eletroporação: 1 pulso alto e curto de 800 V/cm e 100 µs e 1 pulso baixo e longo de 100 V/cm e 400 ms (*High Voltage/Low Voltage – HV/LV*).

### **5.3.8 Administração de hGH – DNA no músculo tibial anterior de camundongos de 40 e 80 dias**

Este bioensaio foi composto de dois grupos com a idade inicial de 40 e 80 dias, com a administração bilateral em ambos os músculos tibial anterior. Foram realizadas duas administrações (dia 1 e 41) do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de solução salina, em dois grupos de idades correspondentes. Todas as administrações foram seguidas de eletroporação HV/LV.

Um quinto e um sexto grupos de camundongos *Scid* de idades correspondentes, foram utilizados como controle positivo para o cálculo do *catch-up* de crescimento.

O número de camundongos utilizados em cada grupo foram: pUC-UBI-hGH administrado em camundongos de 40 dias (n=4); de 80 dias (n=3); salina - 40 dias (n=4); salina de 80 dias (n=4); *Scid* de 40 dias (n=4) e *Scid* - 80 dias (n=5).

#### **5.4 Obtenção de sangue e determinação das medidas de comprimento e pesagem de órgãos**

O sangue de todos os camundongos, tratados ou não, foi obtido via cavidade retro-orbital e processado em plasma para dosagem de glicose, mIGF-I e hGH. Para o processamento, o sangue coletado foi incubado em dois ciclos de 20 min. cada, onde o primeiro foi a 37°C e o segundo a 4°C, seguido de centrifugação a 5.000 rpm durante 7 minutos.

Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical e utilizando um paquímetro digital foram realizadas as medidas finais do comprimento total do corpo e da cauda. Foram também dissecados os fêmures direito e esquerdo, para obtenção das medidas de comprimento, além dos rins direito e esquerdo, baço, fígado, coração e músculos quadríceps direito e esquerdo. Estes órgãos foram pesados em balança digital logo após a dissecação.

#### **5.5 Radioimunoensaio (RIA) para quantificação de hGH**

Os níveis de expressão *in vivo* de hGH foram determinados mediante a utilização de radioimunoensaio específico para este hormônio, padronizado em nosso laboratório (Bellini et al., 2003). Os reagentes utilizados são provenientes do NHPP (*National Hormone and Pituitary Program*). O ensaio apresenta sensibilidade de 0,1 ng hGH/mL e como controle de qualidade são utilizadas preparações comerciais (*Lyphocheck I Immunoassay Plus Control*), com diferentes concentrações deste hormônio.

## 5.6 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 absorvância de 450 nm.

## 5.7 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 absorvância de 490 nm.

## 5.8 Determinação de anticorpos anti-hGH no soro dos camundongos

As amostras de soro foram analisadas para verificar a presença de anticorpos anti-hGH, utilizando um método de precipitação com PEG (Dagnaes – Hansen et al., 2002; Glezer et al., 2006; Cecchi et al. 2014). Foram incubados por 16h a 4°C, 100 µL de soro retirado dos animais, diluído 1:50, adicionados de 50 µL de <sup>125</sup>I-hGH (Ribela et al., 1993; Oliveira et al., 1999), correspondentes a 25.000 cpm (contagem por minuto) ou a aproximadamente 0,2 ng da preparação de <sup>125</sup>I-hGH/tubo, em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,4, 0,1% BSA, 0,01% tween-20. A separação foi realizada pela adição de 150 µL de PEG 6000 25% e 22,5 µL/tubo de soro humano, preparado em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 8,6, seguida de centrifugação a 3.500 rpm por 30 min. Foi realizada uma lavagem do precipitado com 300 µL de

PEG 12,5% e centrifugado novamente. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo policlonal anti-hGH (NHPP).

Foi considerada significativa a presença de anticorpos anti-hGH quando a radioatividade precipitada (*Bound*) das amostras foi maior que a média + 2 DP das contagens obtidas nas amostras de controle negativo (soro do grupo salina). Foi também calculada a porcentagem de ligação específica em relação ao total de  $^{125}\text{I}$  – hGH.

### 5.9 ELISA para determinação de mGH

A dosagem de mGH foi realizada em duplicata utilizando o sistema comercial ELISA da Millipore, que apresenta uma sensibilidade de 0,07 ng/mL. É um método imunoenzimático quantitativo do tipo “sanduíche”, onde uma microplaca de 96 poços é revestida com um anticorpo monoclonal específico e o anticorpo de detecção é conjugado à peroxidase.

### 5.10 Cálculo da porcentagem de recuperação do crescimento (*catch-up growth*)

O *catch-up growth* (CG), porcentagem de aproximação de crescimento dos camundongos *lit/scid* tratados com hGH-DNA em relação ao *Scid*, foi calculado utilizando o peso corpóreo (g) ou o comprimento do corpo total (cm), da cauda (cm), do fêmur (mm), ou a concentração de mIGF-I, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{CG} = (\text{Wt} - \text{Wc}) / (\text{Wn} - \text{Wc}) \times 100$$

onde:

**Wt** = peso ou comprimentos ou concentração de mIGF-I do grupo tratado com o hGH-DNA;

**Wc** = peso ou comprimentos ou concentração de mIGF-I do grupo controle (salina);

**Wn** = peso ou comprimentos ou concentração de mIGF-I do grupo de camundongos normais de mesma idade, não tratados (*Scid*).

Todas as medidas e concentrações foram obtidas ao final dos bioensaios.

## **5.11 Clonagem dos plasmídeos parentais e produção de MC de DNA**

### **5.11.1 Construção dos plasmídeos parentais de minicírculos de hGH e mGH com o promotor do CMV**

Os genes do hGH e mGH (cDNA) foram obtidos de duas construções pT<sub>2</sub>.CMV.hGH e pT<sub>2</sub>.CMV.mGH, do banco de plasmídeos do laboratório do Dr. Lars Aagaard e Dr. Thomas G. Jensen (Universidade de Aarhus, Dinamarca).

Estes genes foram amplificados por PCR, utilizando *primers* específicos para as sequências das fitas moldes dos plasmídeos pT<sub>2</sub>.CMV.hGH e pT<sub>2</sub>.CMV.mGH, respectivamente. A clonagem foi realizada nos sítios de restrição das enzimas *HindIII* e *XbaI* do plasmídeo pMC-CMV, previamente desfosforilado e que foi gentilmente cedido pelo Dr. Jacob Giehm Mikkelsen, da Universidade de Aarhus, Dinamarca. A correta inserção dos genes foi confirmada por análise de restrição com as enzimas *Not I* e *Nhe I* e sequenciamento de ambos os plasmídeos parentais.

### **5.11.2 Obtenção de plasmídeos parentais de minicírculos de hGH e mGH com o promotor da Ubi C**

O promotor do CMV dos plasmídeos parentais dos MC, previamente clonados com os genes do hGH e mGH, foram substituídos pelo promotor da Ubi C, nos sítios de restrição correspondentes às enzimas *Mlu I* e *Sac I*. A sequência correspondente ao promotor da Ubi C foi amplificada por PCR utilizando *primers* específicos. A correta inserção foi confirmada por análise de restrição com as enzimas *Nco I* e *Dra I* e sequenciamento de ambos plasmídeos parentais.

### 5.11.3 Produção de minicírculos de hGH e mGH

Todos os plasmídeos parentais dos MC clonados foram re-transformados na bactéria ZYCY10P35S2T/ZY77 fornecida pelo Dr. Jacob G. Mikkelsen, pelo método do choque térmico. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de ágar resistentes à canamicina.

No primeiro dia, as bactérias re-transformadas foram crescidas em uma pré-cultura contendo 5 mL de meio LB com canamicina (50 µg/µL) durante 8 horas a 37°C e 225 rpm. A seguir, 100 µL da pré-cultura foram adicionadas em 100 mL de meio TB com canamicina (50 µg/µL) e incubadas durante 16 horas nas mesmas condições de agitação e temperatura.

No dia seguinte, o pH foi ajustado para 7 e então foram adicionados 100 mL de meio LB e 700 µL de L-arabinose, e a cultura foi incubada nos mesmos parâmetros de agitação e temperatura durante 8 h.

Após a indução dos MC, a cultura total foi centrifugada e o *pellet* foi purificado com um sistema comercial de midi-prep, seguindo instruções do fabricante.

A produção dos MC foi confirmada por análises de restrição.

### 5.11.4 Transfecção de células HEK 293 com os plasmídeos parentais e minicírculos

Células HEK 293 foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de  $6,5 \times 10^4$  células/placas em meio DMEM *high glucose* acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e 1% de L-glutamina. No segundo dia, 100 ng de cada MC (MC-CMV-hGH, MC-CMV-mGH, MC-UBI-hGH e MC-UBI-mGH) foram diluídos em 100 µL de meio DMEM *high glucose* sem soro e 0,4 µL de lipofectamina. Após 30 minutos, foi completado para o volume de 1 mL de DMEM com soro.

No terceiro dia, os meios de 24 horas foram coletados para dosagem por RIA ou ELISA específicos para cada hormônio (humano ou murino). As células foram contadas e, a partir do resultado da expressão *in vitro*, foi realizado um cálculo de expressão em ng hGH ou mGH/ $10^5$  células/dia.

## 5.12 Análise estatística

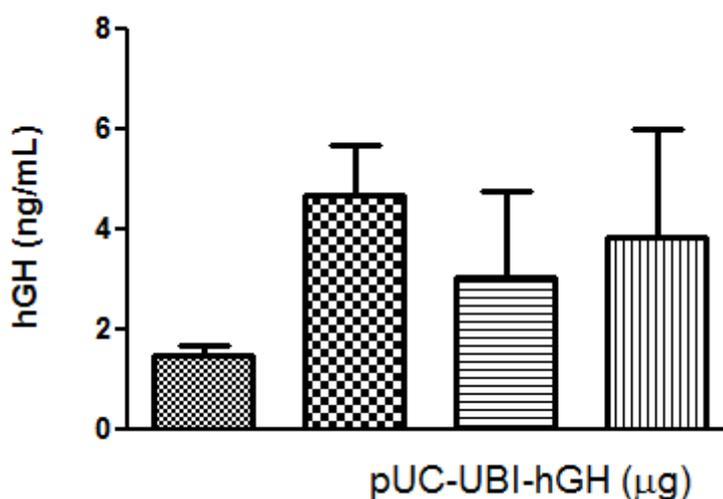
As comparações dos parâmetros de crescimento foram realizadas por meio do teste t de *Student*, considerando-se não significativo  $P > 0,05$ . Os dados foram apresentados como valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP).

Os múltiplos grupos foram analisados utilizando o programa estatístico Graphpad Prism (versão 5.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), mediante análise de variância “two way ANOVA” e pós-teste de Bonferroni, além dos testes de regressão linear e função polinomial quadrática de segunda ordem.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Padronização da quantidade de DNA plasmidial administrada em camundongos *lit/scid*

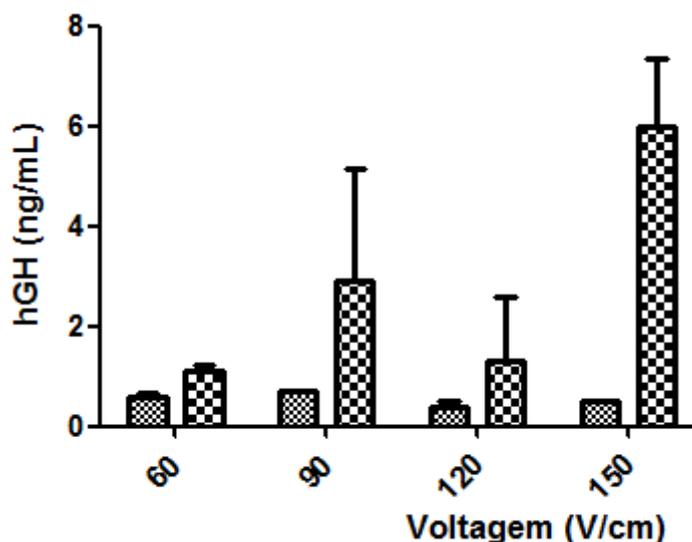
As quantidades de DNA testadas foram 25, 50 e 75  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pUC-UBI-hGH diluído em 50  $\mu\text{L}$  salina, seguido de eletroporação, utilizando os parâmetros padronizados por Oliveira et al. (2010): 8 pulsos de 20 ms, 0,5 s de intervalo e 150 V/cm. Após 3 dias foi coletado o sangue dos camundongos e os níveis de hGH foram determinados por RIA específico (Fig. 5). Uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as 3 quantidades testadas, não foi alterada a quantidade de 50  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial/camundongo para os experimentos subsequentes. Esta quantidade é a mesma empregada em experimentos anteriores e apresentou a melhor relação custo/benefício.



**Fig. 6:** Níveis de hGH após a administração única de 25 (xadrez), 50 (listrada) ou 75  $\mu\text{g}$  (listrada vertical) do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina (hachurada), seguida de eletroporação, em camundongos *lit/scid* (n=3 animais/grupo)

## 6.2 Padronização da voltagem em camundongos *lit/scid*

As voltagens que forneceram uma melhor resposta na expressão de hGH após a administração de 50  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pUC-UBI-hGH foram 90 e 150 V/cm (Fig. 6). Após análise estatística, não houve diferença significativa nos níveis circulatórios de hGH de  $2,89 \pm 2,27$  e  $5,97 \pm 1,38$  entre estas duas voltagens, respectivamente. Com base nestes dados, foram alterados os parâmetros de eletroporação para os próximos experimentos: 8 pulsos de 20 ms, 0,5 s de intervalo e 90 V/cm. A principal justificativa é que a utilização de uma voltagem mais baixa é bastante interessante, por muito provavelmente causar uma menor injúria ao tecido muscular.



**Fig. 7:** Níveis de hGH após a administração única de 50  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pUC-UBI-hGH (▣) ou de solução salina (▤), seguida de eletroporação, em camundongos *lit/scid* (n=3 animais/grupo).

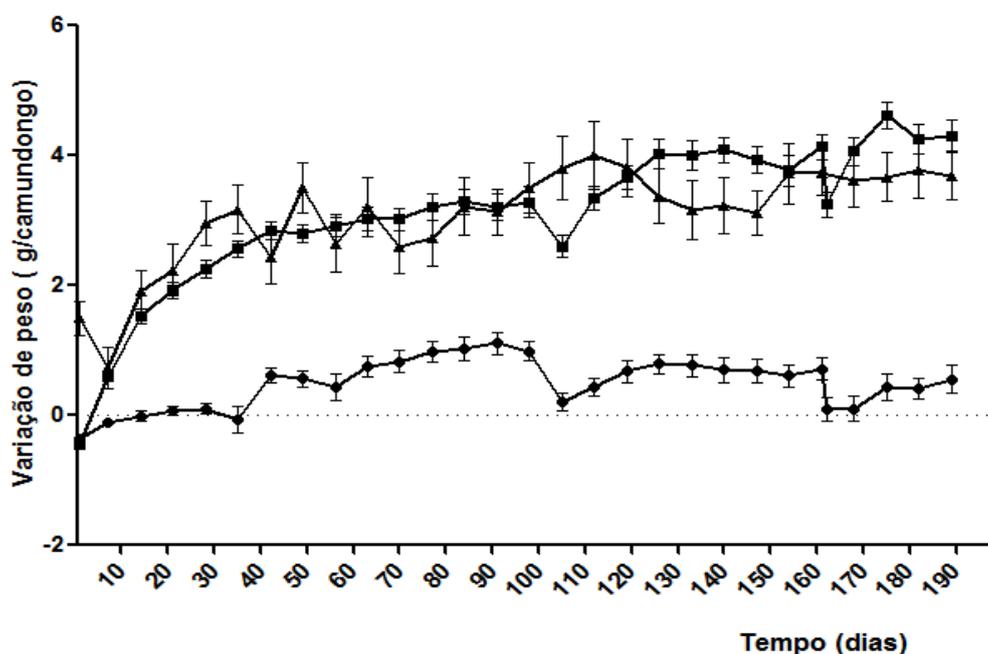
## 6.3 Bioensaio de longa duração (6 meses)

A finalidade deste bioensaio de longa duração foi observar o incremento máximo dos parâmetros de crescimento avaliados dos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial, em relação ao camundongo normal correspondente “wild type”, o *Scid*.

Como pode ser observado na Fig. 7, as curvas de variação de peso entre o grupo tratado e salina foram significativamente diferentes ( $P < 0,0001$ ) após 28 dias, e apresentaram uma inclinação de 0,094 g/camundongo/dia e 0,011 g/camundongo/dia, respectivamente. A inclinação do grupo tratado foi igual ao valor de 0,094 g/camundongo/dia reportado em um ensaio semelhante de 28 dias, o que demonstra a reprodutibilidade deste ensaio, mesmo utilizando uma voltagem menor (Higuti et al., 2012).

Após o 100º dia da administração do DNA plasmidial, observou-se que houve uma estabilização da variação de peso corpóreo, e então com a finalidade de verificar se o grupo tratado seria capaz de apresentar maiores incrementos de peso, foi realizada uma nova administração, no músculo quadríceps esquerdo no 104º dia a partir do tratamento inicial, justificando a perda de peso no 105º dia.

Uma vez que foi observada novamente uma estabilização, foi realizada uma nova administração no dia 161 de 100 µg de hGH-DNA no músculo quadríceps esquerdo exposto, seguido de eletroporação. A finalidade desta nova administração era observar se uma maior quantidade de DNA plasmidial seria capaz de proporcionar um aumento maior de peso.



**Fig. 8:** Variação de peso de camundongos *lit/scid*, após 3 administrações do plasmídeo pUC-UBI-hGH (■) ou de salina (●), seguidas de eletroporação, e de camundongos *Scid* (▲) sem tratamento.

As equações calculadas para cada curva ao final do tratamento, foram ajustadas pela equação polinomial de segunda ordem (quadrática):  $Y=B_0+B_1X+B_2X^2$  e os valores para cada grupo são: salina:  $Y=-0,2238 +0,01882X -8,75 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2=0,6230$ ), hGH-DNA:  $Y= 0,6050 + 0,04323X -221,8 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2=0,8265$ ) e para os *Scid* não tratados:  $Y= 1,219 +0,03556X -12,74 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2=0,7424$ ). As diferenças entre as curvas dos grupos tratados com hGH-DNA e salina foram significativamente diferentes ( $P<0,0001$ ).

Os grupos *lit/scid* tratado e *Scid* sem tratamento apresentaram um crescimento semelhante em relação ao aumento de peso corpóreo, e ambas as curvas de crescimento são estatisticamente diferentes do grupo controle com salina ( $P<0,0001$ ).

Para controlar a resposta ao tratamento nos camundongos *lit/scid* tratados com DNA plasmidial, mensalmente foi realizada a coleta de sangue, para dosagem de hGH, mIGF-I e glicose, e também foram determinadas as medidas do comprimento total do corpo, da cauda e fêmur para todos os grupos ( $n=3$ ). Os dados obtidos do grupo tratado com DNA plasmidial foram comparados com os grupos controle salina e com os camundongos *scid* sem tratamento.

Tabela 1. Parâmetros de crescimento determinados em camundongos lit/scid durante um ensaio de longa duração, baseado em 3 administrações do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguidas de eletroporação no músculo quadríceps

Parâmetros de crescimento/grupos	Antes do tratamento ( $\bar{X} \pm SD$ )	Mês 1 ( $\bar{X} \pm SD$ )	Aumento (%)	Mês 2 ( $\bar{X} \pm SD$ )	Aumento (%)	Mês 3 ( $\bar{X} \pm SD$ )	Aumento (%)	Mês 5 ( $\bar{X} \pm SD$ )	Aumento (%)	Mês 6 ( $\bar{X} \pm SD$ )	Aumento (%)	Catch-up final (%)
<b>Peso corpóreo (g)</b>												
Salina	9,06 ± 1,15	9,34 ± 0,32	8,6	8,01 ± 2,85	-11,6	10,00 ± 0,98	10,4	7,54 ± 0,88	5,3	10,05 ± 0,65	10,9	<b>21,3 ± 4,68</b>
hGH-DNA	9,32 ± 0,99	11,33 ± 2,56	21,6	11,67 ± 1,10	25,2	11,67 ± 0,82	25,2	12,64 ± 0,99	35,6	13,95 ± 0,86	49,7	
Scid não tratado	25,31 ± 3,08	27,16 ± 5,05	7,3	27,60 ± 2,79	9,0	26,89 ± 3,86	6,2	29,79 ± 1,74	17,7	28,32 ± 2,93	11,9	
<b>Comprimento total (cm)</b>												
Salina	12,41 ± 0,60	12,55 ± 0,57	1,1	11,37 ± 1,01	-8,4	12,27 ± 0,38	-1,1	12,48 ± 0,23	0,7	12,81 ± 0,38	3,2	<b>21,0 ± 4,71</b>
hGH-DNA	12,14 ± 0,41	12,50 ± 0,83	3,1	13,47 ± 0,45	11,0	13,17 ± 0,28	8,5	13,71 ± 0,34	12,9	14,13 ± 0,30	16,4	
Scid não tratado	17,31 ± 0,05	18,67 ± 0,68	7,9	18,30 ± 0,17	5,7	17,17 ± 0,31	2,7	18,78 ± 1,02	8,5	19,10 ± 0,62	10,3	
<b>Cauda (cm)</b>												
Salina	6,04 ± 0,25	6,06 ± 0,46	0,3	5,53 ± 0,40	-8,4	5,81 ± 0,23	-3,8	6,24 ± 0,24	3,3	6,32 ± 0,16	4,6	<b>18,7 ± 5,71</b>
hGH-DNA	5,98 ± 0,21	6,39 ± 0,71	6,9	6,33 ± 0,15	5,9	6,50 ± 0,24	8,7	6,63 ± 0,48	10,9	6,96 ± 0,20	16,4	
Scid não tratado	8,76 ± 0,13	9,17 ± 0,45	4,7	9,25 ± 0,21	5,6	8,93 ± 0,25	1,9	9,43 ± 0,22	7,6	9,75 ± 0,26	11,3	
<b>Fêmur direito (mm)</b>												
Salina	10,6 ± 1,3	9,7 ± 0,6	-8,5	9,5 ± 1,4	-10,4	10,2 ± 1,0	-3,8	10,4 ± 0,5	-1,9	10,4 ± 5,4	-1,9	<b>60,4 ± 8,46</b>
hGH-DNA	10,6 ± 1,3	10,4 ± 0,6	-1,9	13,3 ± 1,7	25,5	13,3 ± 0,7	25,5	13,5 ± 7,9	27,4	13,6 ± 4,5	28,3	
Scid não tratado	12,8 ± 0,1	14,8 ± 0,8	15,6	16,9 ± 0,4	32,0	16,0 ± 1,0	25,0	16,2 ± 4,5	26,6	15,7 ± 11,7	22,7	
<b>Fêmur esquerdo (mm)</b>												
Salina	10,6 ± 1,3	9,8 ± 0,3	-7,6	10,0 ± 1,0	-5,7	9,9 ± 1,1	-6,6	10,5 ± 2,6	-0,9	10,3 ± 4,8	-2,8	<b>52,7 ± 12,76</b>
hGH-DNA	10,6 ± 1,3	10,0 ± 0,0	-5,7	13,1 ± 0,3	23,6	11,6 ± 0,7	9,4	12,6 ± 11,9	18,9	13,2 ± 7,0	24,5	
Scid não tratado	12,8 ± 0,0	15,7 ± 1,5	22,7	16,8 ± 0,3	31,2	15,0 ± 0,0	17,2	16,1 ± 2,0	25,8	15,8 ± 7,1	23,4	

Obs: Número de camundongos por grupo antes do tratamento=24 salina; 26 hGH-DNA; 21 Scid. Dados obtidos mensalmente durante o tratamento n=3 para todos os grupos. Ao final do tratamento: n=12 salina; n=13 hGH-DNA; n=3 Scid.

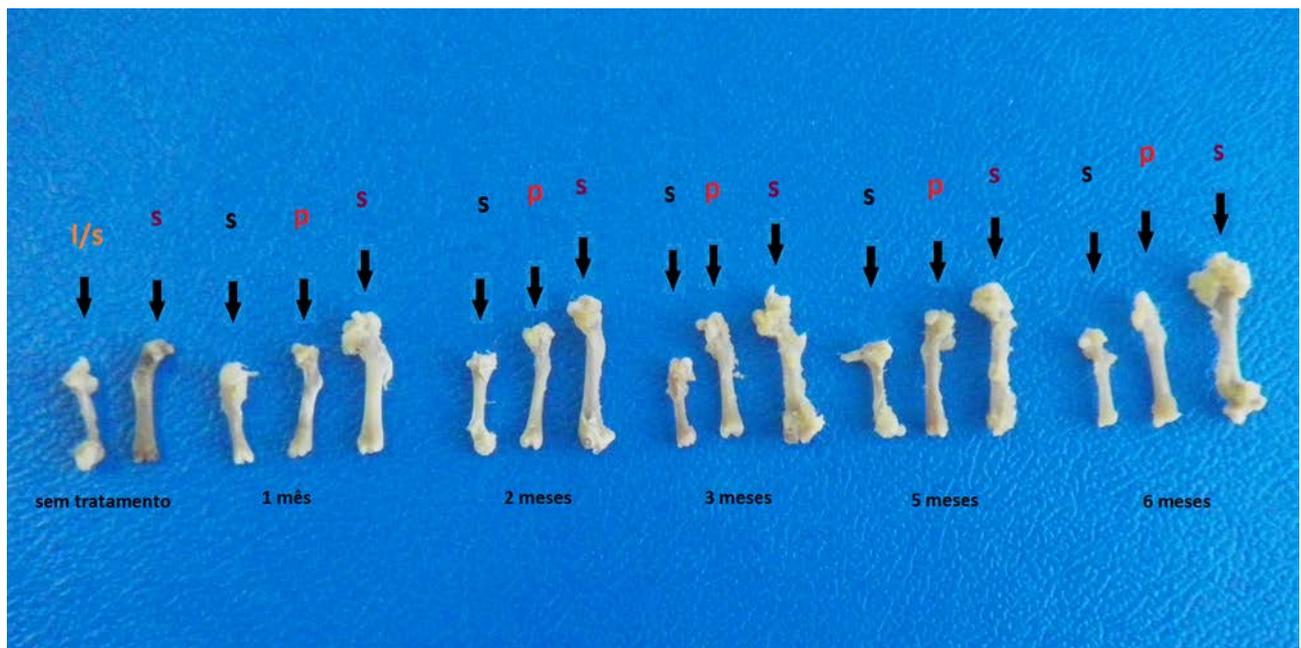
<b>Análise estatística integrada baseada nos valores do catch-up</b>						
<b>Peso corpóreo/tamanho total do corpo/tamanho da cauda</b>			<b>Fêmur direito/fêmur esquerdo</b>			<b>Significância estatística</b>
<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>n</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>	<b>n</b>	
20,39 ± 5,05	24,8	39	56,71 ± 11,36	20,6	26	< 0,0001

Baseado em todos os parâmetros avaliados e apresentados na Tabela 1, o peso corpóreo do grupo tratado com hGH-DNA aumentou em relação ao valor inicial em aproximadamente 50%. E o aumento do comprimento total do corpo do grupo tratado com hGH-DNA foi significativo em relação ao inicial após 2 ( $P<0,05$ ), 3 ( $P<0,05$ ), 5 ( $P<0,01$ ) e 6 ( $P<0,02$ ) meses de tratamento. Houve também um aumento significativo da cauda após 2 ( $P<0,01$ ) e 3 ( $P<0,05$ ) meses.

Os *catch-up* obtidos ao final do tratamento foram entre 19 e 60% e as maiores porcentagens foram para os fêmures direito e esquerdo.

A análise estatística integrada obtida comparando os valores de *catch-up* do peso corpóreo, tamanho total do corpo e da cauda em relação aos comprimentos dos fêmures direito e esquerdo foi altamente significativa ( $P<0,0001$ ).

A Fig. 7 é uma imagem ilustrativa da evolução do tratamento e da diferença entre os grupos. Como podemos observar, durante todo o tratamento, os fêmures direitos do grupo tratado com DNA plasmidial foram maiores que os do grupo salina, porém ainda menores que os fêmures do grupo *Scid* sem tratamento.



**Fig. 9:** Exemplos de fêmures direitos dissecados de camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH (**p**) ou salina (**s**), de camundongo *lit/scid* não tratado (**l/c**) e de camundongos *Scid* sem tratamento (**s**).

Foram dissecados alguns órgãos para comparar os efeitos autócrino/parácrino e endócrino da administração do hGH-DNA, seguida de eletroporação, em relação aos grupos salina e de camundongos *Scid* sem tratamento. Os dados obtidos e o *catch-up* calculado estão na Tabela 2.

As diferenças dos valores médios dos pesos dos órgãos do grupo tratado, após o 6º mês em relação à média inicial do grupo, foram significativamente maiores para os músculos quadríceps direito ( $P < 0,001$ ) e esquerdo ( $P < 0,005$ ) e baço ( $P < 0,001$ ). Quando comparados os valores finais do grupo tratado com DNA plasmidial em relação à média final do grupo controle (salina), foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ) para todos os órgãos analisados.

Os órgãos dos camundongos tratados com hGH-DNA que tiveram um *catch-up* superior a 30%, a partir do primeiro mês até o final do tratamento, foram: músculo quadríceps direito, rins direito e esquerdo, baço e fígado.

Quanto aos valores anormais para o peso do baço, acreditamos que possa ser em razão de um efeito inflamatório da cirurgia, uma vez que o mesmo também aconteceu com o grupo salina (dados não mostrados).

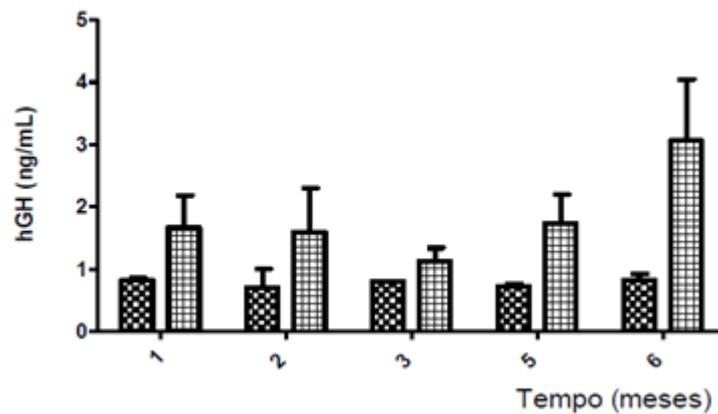
Apesar da maioria das porcentagens do 2º mês terem sido maiores que as do 3º mês, é fundamental ressaltar que para cada coleta mensal os camundongos foram escolhidos aleatoriamente ( $n=3$ ), o que fez com que ocorresse este tipo de diferença entre os meses.

**Tabela 2:** Pesos de órgãos dissecados de camundongos *lit/scid* após diferentes tempos das administrações intramusculares do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguidas de eletroporação, e porcentagem de recuperação (*catch-up*) em relação aos camundongos *Scid* sem tratamento.

Órgão	Inicial		1 mês		2 meses		3 meses		5 meses		6 meses	
	hGH - DNA (mg)	Catch-up (%)										
Músculo quadríceps direito	41,3 ± 2,1	31,8	59,0 ± 16,7	43,1	79,3 ± 30,4	65,2	56,3 ± 10,6	39,6	71,7 ± 32,7	48,2	77,3 ± 13,8	57,7
Músculo quadríceps esquerdo	40,3 ± 3,2	31,8	44,7 ± 2,1	31,9	46,7 ± 22,2	40,8	27,0 ± 12,5	16,1	63,0 ± 17,4	42,8	70,5 ± 13,7	54,7
Rim direito	65,7 ± 5,1	50,6	78,3 ± 19,1	36,0	66,0 ± 13,8	34,0	70,3 ± 17,6	33,9	77,0 ± 2,7	29,5	86,8 ± 23,1	44,6
Rim esquerdo	66,7 ± 4,0	49,1	75,0 ± 14,0	37,1	67,7 ± 15,7	36,1	76,3 ± 17,2	34,0	80,0 ± 5,2	32,4	86,4 ± 18,2	47,6
Baço	31,3 ± 8,1	70,1	125,3 ± 41,3	321,4	74,3 ± 38,2	159,3	114,0 ± 50,5	135,7	73,3 ± 7,5	70,7	89,5 ± 50,0	180,1
Fígado	481,7 ± 83,3	49,5	512,3 ± 58,7	37,1	501,3 ± 29,8	42,3	515,3 ± 20,2	33,9	557,7 ± 41,5	37,3	549,4 ± 75,9	50,3
Coração	53,0 ± 4,4	47,6	56,0 ± 4,6	30,6	64,0 ± 23,4	23,4	67,0 ± 20,8	29,0	80,3 ± 8,0	44,5	69,9 ± 15,6	46,2

### 6.3.1 Determinação de hGH

As concentrações de hGH na circulação dos camundongos *lit/scid* tratados e controles foram determinadas mensalmente. Como pode ser observado na Fig. 8, os níveis foram sempre mais elevados para o grupo que recebeu o hGH-DNA em relação ao grupo salina, principalmente no final do ensaio ( $P < 0,001$ ).



**Fig. 10:** Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH (▨) ou salina (■), seguidos de eletrotransferência.

### 6.3.2 Determinação de mIGF-I

Os valores de mIGF-I dos camundongos tratados com o DNA plasmidial foram significativamente 7x superiores aos obtidos para o grupo salina durante todos os meses de tratamento, porém ainda 2 x menores que os observados nos camundongos *Scid* sem tratamento (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentrações plasmáticas de mIGF-I em camundongos *lit/scid* após a administração intramuscular do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguida de eletroporação, e em camundongos *Scid* sem tratamento.

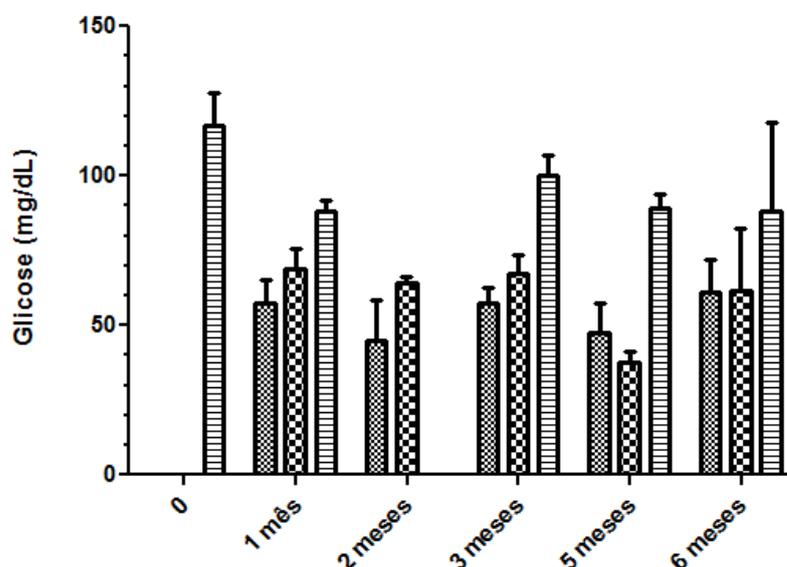
Grupos	n	Idade (meses)	mIGF-I (ng/mL) ± DP	CV	Significância estatística em relação ao grupo salina
<b><i>lit/scid</i> sem tratamento</b>	3	3	27,7 ± 9,3	33,6	-----
<b><i>lit/scid</i> tratados com salina</b>					
mês 1	3	4	21,8 ± 7,5	34,5	-----
mês 2	3	5	24,7 ± 1,5	6,2	-----
mês 3	3	6	27,0 ± 5,0	18,5	-----
mês 5	3	8	27,3 ± 9,8	35,9	-----
mês 6	8	9	36,1 ± 13,5	37,4	-----
<b><i>lit/scid</i> tratados com hGH-DNA</b>					
mês 1	3	4	146,7 ± 73,2	49,9	P<0,01
mês 2	3	5	119,2 ± 26,5	22,2	P<0,001
mês 3	3	6	161,7 ± 18,9	11,7	P<0,001
mês 5	3	8	158,3 ± 54,8	34,6	P<0,01
mês 6	8	9	241,6 ± 67,4	27,9	P<0,001
<b><i>Scid</i> não tratados</b>					
mês 1	3	4	683,3 ± 52,0	7,6	P<0,001
mês 2	3	5	716,7 ± 142,0	19,8	P<0,005
mês 3	3	6	485,0 ± 78,6	16,2	P<0,001
mês 5	3	8	472,5 ± 74,3	15,7	P<0,001
mês 6	7	9	443,9 ± 97,9	22,1	P<0,001

### 6.3.3 Dosagem de glicose

A determinação de glicose foi utilizada no ensaio de longa duração para avaliar a segurança do tratamento, uma vez que a exposição crônica e acima dos níveis fisiológicos considerados normais para o GH pode levar ao antagonismo da insulina, acarretando em um aumento na concentração de glicose no plasma, podendo levar o indivíduo a um estado de diabetes (Jorgensen et al., 2007; Moller; Jorgensen, 2009; Jorgensen et al., 2010).

As concentrações obtidas para os 3 grupos não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ), quando comparados os valores do tratado com hGH-DNA em

relação ao grupo controle salina e dos camundongos *Scid* sem tratamento, durante todo o tempo de ensaio (Fig. 9).



**Fig. 11:** Determinação da concentração de glicose no plasma de camundongos tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH (▨) ou salina (▩), seguidos de eletroporação, e de camundongos *Scid* sem tratamento (▧).

#### 6.3.4 Determinação de anticorpos anti-hGH

A presença de anticorpos anti-hGH no soro dos camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo hGH-DNA foi analisada, uma vez que o próprio fornecedor (The Jackson Laboratories, EUA) afirma que esses animais imunodeficientes podem apresentar uma imunorreatividade parcial (*leakiness*) desenvolvida espontaneamente, levando à produção de células B ou T. Como pode ser observado na Tabela 4, após o segundo mês da administração inicial do plasmídeo, o soro dos camundongos tratados apresentou a formação de anticorpos anti-hGH (ligação específica de ~14%), significativamente maior que a apresentada pelos camundongos controle (ligação de ~7%).

**Tabela 4:** Determinação de anticorpos anti-hGH no soro dos camundongos *lit/scid* tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguidos de eletroporação

Grupo de animal	n	Radioatividade medida (CPM ± DP)	Ligação específica (%)
Salina 1 mês	2	2314 ± 23	6,7
pUC-UBI-hGH 1 mês	3	1950 ± 74	5,3
Salina 2 meses	3	2305 ± 154	6,6
pUC-UBI-hGH 2 meses	3	4458 ± 55	13,9
Salina 3 meses	3	1945 ± 169	5,2
pUC-UBI-hGH 3 meses	3	4306 ± 236	14,3
Salina 5 meses	3	1919 ± 241	5,1
pUC-UBI-hGH 5 meses	3	4083 ± 158	13,5
Salina 6 meses	4	2252 ± 315	6,5
pUC-UBI-hGH 6 meses	11	4312 ± 252	14,3

#### 6.4 Relação entre diferentes quantidades de DNA plasmidial e secreção de mIGF-I

Foi realizado um ensaio utilizando 50 e 100 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, administrado em camundongos *lit/scid*, para verificar se uma quantidade maior de DNA plasmidial, no início do tratamento, seria capaz de aumentar significativamente a secreção de mIGF-I.

Após análise estatística utilizando o teste T de *Student* e análise de variância *two-way anova* e pós-teste de Bonferroni não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de mIGF-I entre os grupos tratados, após 7 e 14 dias (Tabela 5), apesar da administração do dobro da quantidade de plasmídeo utilizada em nosso protocolo.

**Tabela 5:** Concentrações plasmáticas de mIGF-I em camundongos *lit/scid* após administração intramuscular de 50 ou 100 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguida de eletroporação

Grupo	mIGF-I (ng/mL) + DP
salina * <sup>1</sup>	58,0 ± 20,7
salina * <sup>2</sup>	53,3 ± 23,9
pUC-UBI-hGH 50 µg * <sup>1</sup>	146,7 ± 29,3
pUC-UBI-hGH 50 µg * <sup>3</sup>	155,7 ± 35,5
pUC-UBI-hGH 100 µg * <sup>1</sup>	163,3 ± 43,7
pUC-UBI-hGH 100 µg * <sup>3</sup>	121,1 ± 31,6

\*<sup>1</sup>n=3, após 7 dias; \*<sup>2</sup>n=6 e \*<sup>3</sup>n=7, após 14 dias

### 6.5 Avaliação dos parâmetros de crescimento após a administração de DNA plasmidial em camundongos de diferentes idades

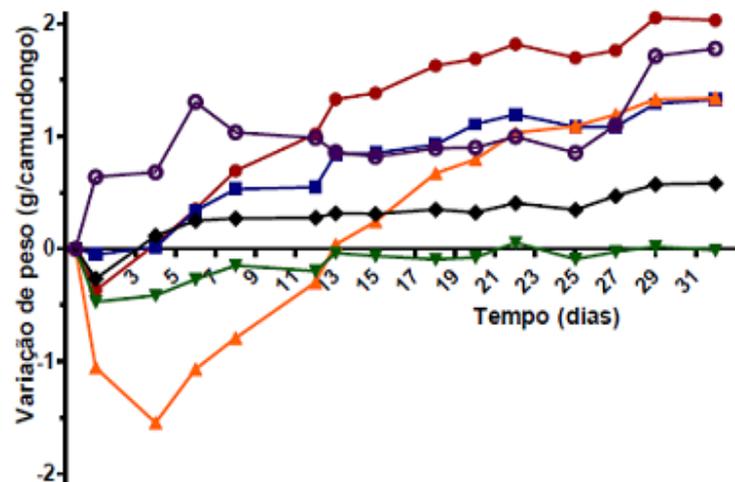
Considerando que os camundongos *Scid* são aproximadamente 3 vezes maiores que os camundongos *lit/scid* no início do tratamento e que a idade inicial de 80 dias corresponde à fase adulta, foi realizada uma administração de hGH-DNA, utilizando os mesmos parâmetros do experimento de longa duração em camundongos de ~60 e ~80 dias.

Este experimento também tinha a finalidade de aumentar os níveis de mIGF-I e dos parâmetros de crescimento. Além disso, foram realizados testes de administração de hGH-DNA em ambos os quadríceps no início do tratamento, e também um grupo tratado sem a administração prévia da enzima hialuronidase.

Durante este ensaio, foram utilizados camundongos *lit/scid* heterozigotos sem tratamento com idade inicial de 60 dias, como controle positivo dos parâmetros de crescimento de camundongos não-deficientes de GH.

Como podemos observar na Fig. 10, ao final do tratamento o grupo tratado com a idade inicial de 60 dias apresentou uma maior variação de peso corpóreo em relação ao grupo de 80 dias durante todo o tratamento, além de uma porcentagem de crescimento ~18% maior em relação aos camundongos mais velhos. O grupo tratado

em ambos os quadríceps apresentou uma maior queda inicial do peso corpóreo em relação aos outros grupos, porém ao final do tratamento, a porcentagem de aumento de peso (~15%) foi significativa ( $P < 0,025$ ) em relação aos valores iniciais deste grupo. O grupo tratado sem a enzima hialuronidase não apresentou melhora em nenhum dos parâmetros analisados, o que comprova a necessidade da utilização desta enzima.



**Fig. 12:** Variação de peso de camundongos *lit/scid* após diferentes tratamentos: pUC-UBI-hGH em camundongos de 60 (●) e 80 (■) dias de idade, pUC-UBI-hGH administrado bilateralmente nos músculos quadríceps expostos (▲), pUC-UBI-hGH sem hialuronidase (◆), salina (▼) e de camundongos *scid* heterozigotos sem tratamento (●).

Ao final do tratamento, o grupo de camundongos mais jovens foi capaz de apresentar uma melhora significativa de todos os parâmetros analisados (aumento de peso corpóreo e do comprimento do corpo, da cauda e do fêmur), em relação ao grupo controle e o mesmo não foi observado para o grupo de camundongos mais velhos (Tabelas 6 e 7).

**Tabela 6:** Parâmetros de crescimento de camundongos *lit/scid* de 60 ou 80 dias de idade, após 30 dias de diferentes tratamentos com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguidos de eletroporação.

Parâmetro de crescimento	Antes do tratamento	Final do tratamento	Aumento versus inicial (%)	P <sup>*6</sup>
<b>Peso corpóreo (g)</b>				
Controle (salina) <sup>*1</sup>	9,22 ± 0,40	9,36 ± 0,40	1,5	n.s.
pUC-UBI-hGH 60 dias <sup>*2</sup>	7,93 ± 0,80	10,16 ± 1,30	28,1	P<0,005
pUC-UBI-hGH 80 dias <sup>*3</sup>	9,37 ± 0,90	10,38 ± 1,00	10,8	n.s.
2 quadríceps <sup>*4</sup>	9,14 ± 1,00	10,52 ± 1,00	15,1	P<0,025
sem hialuronidase <sup>*5</sup>	9,18 ± 0,70	9,72 ± 0,60	5,9	n.s.
<b>Comprimento da cauda (cm)</b>				
Controle (salina) <sup>*1</sup>	6,00 ± 0,20	6,14 ± 0,10	2,3	n.s.
pUC-UBI-hGH 60 dias <sup>*2</sup>	5,58 ± 0,20	5,99 ± 0,20	7,4	P<0,01
pUC-UBI-hGH 80 dias <sup>*3</sup>	5,70 ± 0,30	5,98 ± 0,20	4,9	n.s.
2 quadríceps <sup>*4</sup>	5,60 ± 0,30	5,81 ± 0,30	3,8	n.s.
sem hialuronidase <sup>*5</sup>	6,11 ± 0,20	6,23 ± 0,20	2,0	n.s.
<b>Comprimento total do corpo (cm)</b>				
Controle (salina) <sup>*1</sup>	12,63 ± 0,20	12,37 ± 0,40	-2,1	n.s.
pUC-UBI-hGH 60 dias <sup>*2</sup>	11,72 ± 0,30	12,38 ± 0,30	5,6	P<0,005
pUC-UBI-hGH 80 dias <sup>*3</sup>	12,10 ± 0,60	12,46 ± 0,60	3,0	n.s.
2 quadríceps <sup>*4</sup>	11,87 ± 0,50	12,44 ± 0,40	4,8	P<0,05
sem hialuronidase <sup>*5</sup>	12,35 ± 0,20	12,53 ± 0,40	1,5	n.s.

\*1 n=7; \*2 n= 6; \*3 n=7; \*4 n=7; \*5 n= 3; \*6 Níveis de significância calculados em relação aos valores iniciais do mesmo grupo

As medidas finais de todos os fêmures direitos dos grupos tratados com hGH-DNA foram significativamente superiores aos do grupo controle, porém somente o fêmur esquerdo do grupo tratado em ambos os lados apresentou um aumento significativo (P<0,001) em relação ao grupo controle, resultado da ação endócrina/parácrina da administração do plasmídeo no local (Tabela 7).

**Tabela 7:** Medidas finais dos fêmures direito e esquerdo de camundongos *lit/scid* de 60 e 80 dias de idade, após diferentes tratamentos com o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguidos de eletroporação.

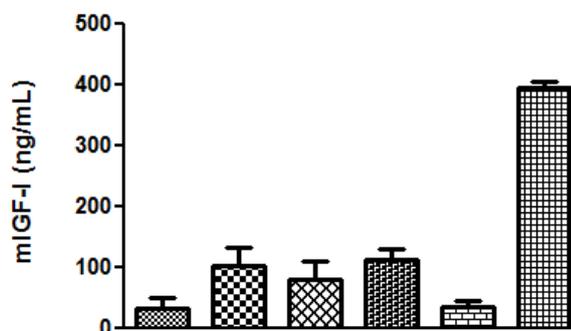
Comprimento do fêmur direito (mm)	Salina <sup>*1</sup> (final)	Final do tratamento	Aumento versus salina (final)	P <sup>*6</sup>
pUC-UBI-hGH 60 dias <sup>*2</sup>		11,35 ± 0,80	16,1	P<0,001
pUC-UBI-hGH 80 dias <sup>*3</sup>		10,91 ± 0,90	11,6	P<0,005
2 quadríceps <sup>*4</sup>	9,78 ± 0,30	11,05 ± 0,50	13,0	P<0,001
sem hialuronidase <sup>*5</sup>		10,87 ± 0,40	11,1	P<0,005

Comprimento do fêmur esquerdo (mm)				
pUC-UBI-hGH 60 dias <sup>*2</sup>		10,10 ± 0,50	2,5	n.s.
pUC-UBI-hGH 80 dias <sup>*3</sup>		10,04 ± 0,70	1,9	n.s.
2 quadríceps <sup>*4</sup>	9,85 ± 0,30	10,87 ± 0,40	10,4	P<0,001
sem hialuronidase <sup>*5</sup>		10,05 ± 0,30	2,0	n.s.

<sup>\*1</sup> n=7; <sup>\*2</sup> n=6; <sup>\*3</sup> n=7; <sup>\*4</sup> n=7; <sup>\*5</sup> n=3; <sup>\*6</sup> Níveis de significância calculados em relação aos valores finais do grupo salina

Os níveis de mIGF-I (Fig. 11) dos grupos tratados com hGH-DNA (60 e 80 dias e 2 quadríceps) foram significativamente maiores em relação ao grupo controle salina (P<0,05), porém não houve diferença significativa entre os 3 grupos tratados e estes valores foram inferiores aos níveis obtidos nos camundongos heterozigotos sem tratamento.



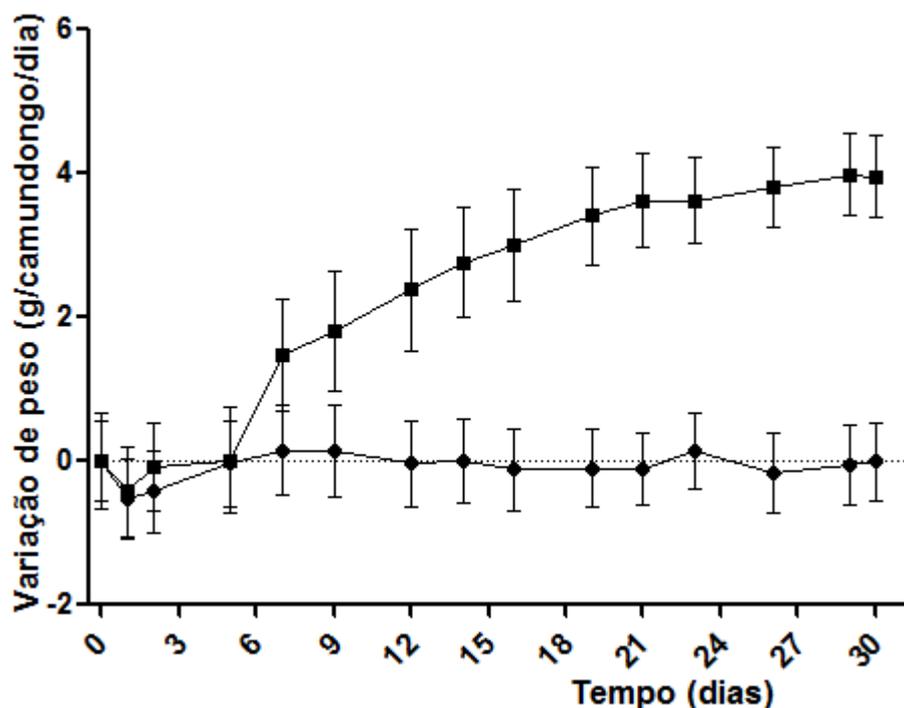
**Fig. 13:** Níveis plasmáticos de mIGF-I de camundongos de 60 (▨) e 80 dias (▩) no início do tratamento, camundongos tratados com DNA plasmidial em ambos os quadríceps (▧), não tratados previamente com hialuronidase (▪) ou tratados com salina (▫), seguidos de eletroporação, e de camundongos *scid* heterozigotos sem tratamento (▩).

## 6.6 Administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH no músculo de camundongos *lit/scid* de 40 dias

Uma vez que os resultados da administração do hGH-DNA, seguida de eletroporação, foram mais significativos em camundongos mais jovens, foi decidido realizar um novo experimento de 30 dias, utilizando camundongos de 40 dias de idade no início do tratamento.

Para este experimento foi diminuído o volume de diluição do hGH-DNA (50 µg/20 µL) e salina (20 µL), uma vez que esta mudança poderia ser significativa na eficiência da administração, em razão do tamanho reduzido do músculo quadríceps destes animais.

Embora o grupo tratado e controle tenham apresentado a queda de peso no início do experimento, em razão da cirurgia, o grupo de camundongos tratados recuperou o peso após 5 dias e manteve uma variação muito maior em relação ao grupo controle, até o final do experimento (Fig. 12).



**Fig. 14:** Variação de peso de camundongos *lit/scid* de 40 (■) dias de idade no momento da administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de solução salina (●), seguida de eletroporação, no músculo quadríceps direito exposto (n=7 para todos os grupos).

As equações obtidas para cada curva de variação de crescimento foram: salina:  $Y = -0,2457 + 0,02841X - 78,73 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2 = 0,2034$ ) e para o grupo hGH-DNA:  $Y = -0,5571 + 0,2969X - 486,3 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2 = 0,9717$ ). As diferenças entre as curvas foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,0001$ ).

Ao final de 30 dias, foi coletado o sangue para determinação de mIGF-I e foram determinadas as medidas dos parâmetros de crescimento. Como pode ser observado na Tabela 8, o grupo de camundongos tratados com hGH-DNA apresentou um aumento significativo de todos os parâmetros de crescimento em relação aos obtidos no grupo controle.

**Tabela 8:** Parâmetros de crescimento após 30 dias da administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou salina, seguida de eletroporação, no músculo quadríceps de camundongos *lit/scid* de 40 dias

Parâmetros de crescimento	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)	Porcentagem de aumento (%) <sup>*1</sup>
<b>Peso corpóreo (g)</b>			
salina	9,72 ± 0,77	9,50 ± 1,04	-0,2
hGH-DNA	6,65 ± 1,26	10,60 ± 0,79	64,2
<b>Comprimento total do corpo (cm)</b>			
salina	12,29 ± 0,47	12,16 ± 0,51	-1,2
hGH-DNA	10,96 ± 0,63	12,57 ± 0,44	14,9
<b>Comprimento da cauda (cm)</b>			
salina	5,80 ± 0,33	6,05 ± 0,25	1,5
hGH-DNA	5,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33	16,9

\*1 Porcentagem de aumento em relação aos valores iniciais

Foram também dissecados os fêmures direito e esquerdo de todos os camundongos, com o objetivo de avaliar o crescimento ósseo em consequência do tratamento com o DNA plasmidial, em relação ao grupo salina.

A porcentagem média de aumento do fêmur direito do grupo tratado com o hGH-DNA foi 15% superior em relação ao grupo controle. Observa-se novamente que o aumento do fêmur do grupo tratado está relacionado principalmente aos efeitos autócrinos e parácrinos do GH, uma vez que não houve um aumento significativo da

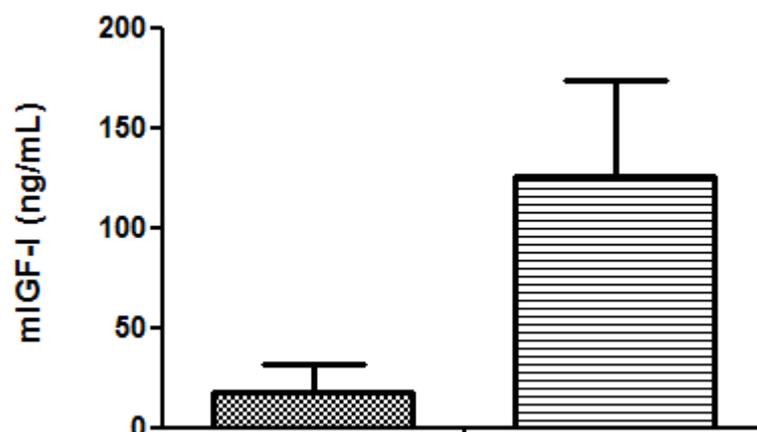
porcentagem no fêmur esquerdo do grupo tratado em relação ao grupo controle (Tabela 9).

**Tabela 9:** Comprimento dos fêmures direito e esquerdo dos camundongos *lit/scid* de 40 dias tratados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH e salina, após 30 dias

Grupo	Comprimento final do fêmur direito (mm)	Porcentagem de crescimento do fêmur direito* (%)	Comprimento final do fêmur esquerdo (mm)	Porcentagem de crescimento do fêmur esquerdo* (%)
salina	9,88 ± 0,37	-----	10,18 ± 0,81	-----
hGH-DNA	11,38 ± 0,66	15,2	10,09 ± 0,39	-0,8

\* Porcentagem do grupo tratado em relação ao grupo salina

Os níveis de mIGF-I (Fig. 13) do grupo de camundongos tratados com o hGH-DNA foram significativamente maiores ( $P < 0,001$ ) em relação ao grupo controle, após 30 dias da administração do hGH-DNA ou de salina.



**Fig. 15:** Níveis de mIGF-I de camundongos *lit/scid* de 40 dias de idade, tratados com hGH-DNA (▨) ou salina (▩), seguidos de eletroporação, após 30 dias da administração.

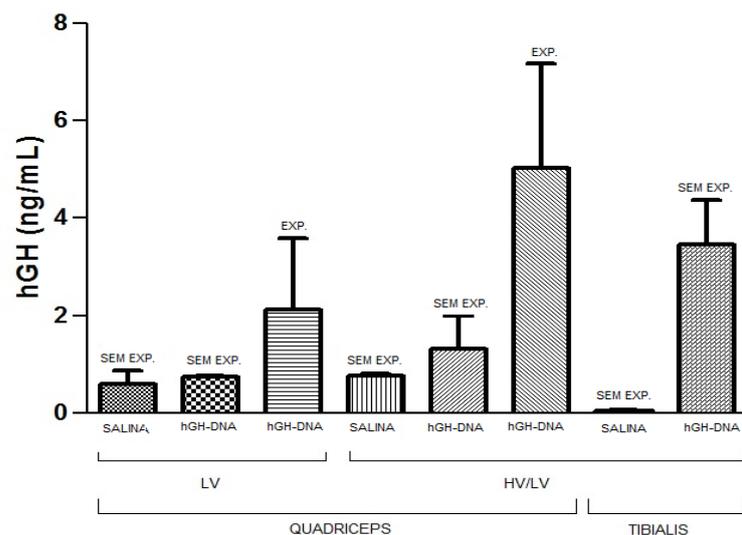
### 6.7 Administração de DNA plasmidial, seguida de diferentes parâmetros de eletroporação, em diferentes músculos (quadríceps ou tibial anterior)

Foi realizado um experimento de administração do hGH-DNA utilizando diferentes músculos e parâmetros de eletrotransferência. O principal objetivo foi observar se a administração deste plasmídeo, sem a exposição prévia do músculo

seria capaz de expressar o hGH em uma quantidade comparável a dos grupos tratados com a metodologia utilizada nos experimentos anteriores, ou seja, músculo quadríceps exposto e parâmetros previamente padronizados (Oliveira et al., 2010).

A administração foi realizada nos músculos quadríceps direito exposto e não exposto e tibial anterior (TA) sem exposição, diminuindo também o volume da enzima hialuronidase (20 U/20  $\mu$ L). A eletroporação foi realizada utilizando os parâmetros HV/LV (*high and low voltage*): um pulso alto e curto (800 V/cm e 100  $\mu$ s) e um pulso baixo e longo (100 V/cm e 400 ms) ou os mesmos dos experimentos anteriores (8 pulsos de 20 ms, 0,5 s de intervalo e 90 V/cm).

Após 3 dias da administração, o sangue foi coletado para a determinação de hGH no soro dos camundongos *lit/scid*. Como pode ser observado na Fig. 14, os grupos que tiveram os maiores níveis deste hormônio foram tratados no músculo quadríceps com exposição (5,03  $\pm$  2,15 ng/mL), ou no músculo tibial anterior sem exposição (3,45  $\pm$  0,91 ng/mL), ambos seguidos de eletrotransferência de alta e baixa voltagem (HV/LV). Não havendo diferença significativa entre esses grupos ( $P > 0,05$ ) e com o objetivo de diminuir a invasividade da metodologia, a eletrotransferência HV/LV no músculo tibial anterior não exposto foi escolhida como a melhor condição a ser utilizada nos próximos ensaios.



**Fig. 16:** Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/scid* após a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina nos músculos quadríceps direito com e sem exposição ou tibialis anterior sem exposição, seguida de eletrotransferência LV (*low voltage*: 8 pulsos de 20 ms, 0,5 s de intervalo e 90 V/cm) ou HV/LV (*high and low voltage*: um pulso de 800 V/cm e 100  $\mu$ s, seguido de um pulso de 100 V/cm e 400 ms) (n=3 animais/grupo).

## **6.8 Administração de DNA plasmidial no músculo tibial anterior direito e esquerdo, seguida de eletroporação**

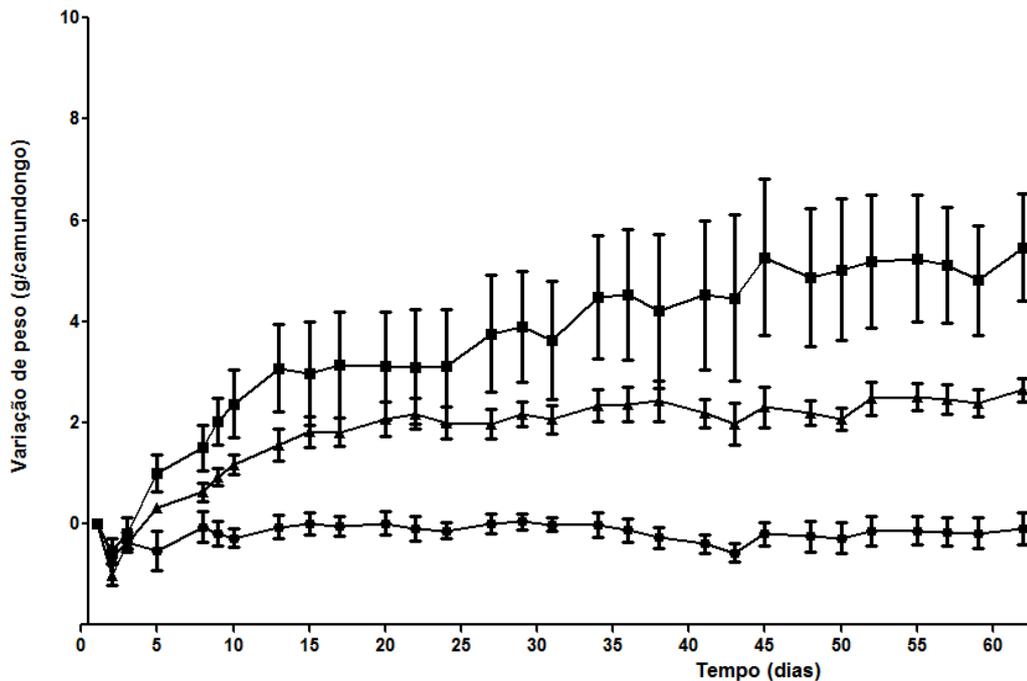
Com base nos resultados do experimento anterior, foram realizadas administrações de hGH-DNA em camundongos de 40 e 80 dias, no músculo tibial anterior direito e esquerdo não expostos, seguidas de eletrotransferência, utilizando o parâmetro de alta e baixa voltagem (HV/LV).

Este experimento tinha como objetivo avaliar a possibilidade de realizar este tipo de administração sem a necessidade de exposição do músculo. Esta exposição, embora seja bastante eficiente, como observado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014), não seria ideal para um protocolo clínico experimental, no qual deveria ser utilizada uma metodologia que fosse menos inconveniente ao paciente com DGH.

Para isso foi observada a variação máxima de peso corpóreo e dos parâmetros de crescimento (comprimento total do corpo, da cauda, dos fêmures e nível de mIGF-I) após a administração do DNA-hGH. Para equilibrar os efeitos autócrinos/parácrinos, principalmente no aumento dos fêmures, a administração foi realizada nos músculos direito e esquerdo.

Após 30 dias a variação de peso corpóreo do grupo tratado de 40 dias foi de 3,64 g em relação ao dia inicial ao tratamento, um valor muito superior ao do grupo de 80 dias que foi de 2,07 g e do grupo controle, de -0,01 g/camundongo/dia. Após ter sido observada uma estabilização na variação de peso corpóreo dos grupos tratados, foi realizada uma segunda administração (dia 41) nos grupos tratados e controles (salina), utilizando os mesmos parâmetros da primeira administração.

Após 60 dias o experimento foi finalizado, uma vez que não foram observados incrementos significativos na variação de peso corpóreo dos grupos tratados após a segunda administração (Fig.15). No final do tratamento, a inclinação da curva de variação de peso do grupo tratado de 40 dias (0,083 g/camundongo/dia) foi 2 vezes maior do que a observada no grupo tratado de 80 dias (0,040 g/camundongo/dia). As inclinações para ambos os grupos foram muito superiores em relação à do grupo controle (0,001 g/camundongo/dia).



**Fig. 17:** Variação de peso em camundongos *lit/scid* de 40 (■) e 80 dias (▲), após administrações bilaterais de hGH-DNA ou solução salina (●), seguidas de eletroporação, nos músculos tibiais anteriores.

As equações obtidas para as curvas de variação de peso foram para o grupo salina:  $Y = -0,2584 + 0,00738X - 12,74 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2 = 0,0355$ ), hGH-DNA 40 dias:  $Y = 0,2065 + 0,1811X + 168,5 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2 = 0,9393$ ) e para o grupo tratado com hGH-DNA de 80 dias:  $Y = -0,1182 + 0,1189X + 135,5 \times 10^{-5}X^2$  ( $R^2 = 0,8479$ ). As diferenças entre as curvas dos grupos tratados com DNA plasmidial foram altamente significativas ( $P < 0,0001$ ).

Como pode ser observado na Tabela 10, todos os parâmetros de crescimento foram superiores para o grupo de camundongos jovens tratados com hGH-DNA em relação aos de 80 dias e controle (salina). É importante ressaltar que nunca foi obtida por nosso grupo uma porcentagem tão alta de aumento dos parâmetros de crescimento, após a administração de hGH-DNA, como foi observado neste experimento.

O grupo de camundongos jovens (40 dias), apresentou uma porcentagem de variação de peso de aproximadamente 84% em relação ao início após 60 dias, além de um aumento do tamanho total do corpo de 24,2% e do comprimento da cauda de 22,2%. O mesmo incremento não foi observado no grupo de camundongos de 80

dias, confirmando a hipótese de que a idade é um parâmetro importante a ser observado no início dos experimentos.

Os grupos de camundongos de 40 e 80 dias tratados com o hGH-DNA apresentaram no final do tratamento, uma porcentagem de recuperação em relação a camundongos *Scid* de idade correspondentes, de  $35,5 \pm 22,4$  e  $25,6 \pm 11,7$  para o comprimento total do corpo;  $39,3 \pm 18,2$  e  $22,8 \pm 9,7$  para o tamanho da cauda e do comprimento dos fêmures, de  $76,2 \pm 36,4$  e  $39,9 \pm 10,4$ , respectivamente.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que este tipo de terapia gênica é mais eficiente em camundongos mais jovens, uma vez que no bioensaio de longa duração utilizando camundongos *lit/scid* de  $\pm 80$  dias de vida e após 3 administrações do plasmídeo pUC-UBI-hGH, foi obtido um aumento de peso corpóreo de aproximadamente 50%, um aumento do total do corpo de 16,4% e da cauda de 16,4% no final do experimento de 6 meses.

**Tabela 10:** Parâmetros de crescimento diretamente relacionados ao crescimento longitudinal determinados antes e após a administração de hGH-DNA no músculos tibiais anterior direito e esquerdo de camundongos *lit/scid* de 40 e 80 dias

Parâmetro de crescimento e grupos tratados	n	Antes do tratamento ( $\bar{x} \pm SD$ )	Final do tratamento ( $\bar{x} \pm SD$ )	Aumento (%)	Catch-up (%)
<b>Comprimento total do corpo (cm)</b>					
Salina - 40 dias	4	10,79 ± 0,60	12,04 ± 0,24	11,6	
hGH-DNA - 40 dias	3	10,79 ± 0,60	13,19 ± 0,70	22,2	35,5 ± 22,4
Scid não tratado - 40 dias	4	14,01 ± 0,31	15,27 ± 0,85	9,0	
Salina - 80 dias	4	12,16 ± 0,20	12,51 ± 0,25	2,9	
hGH-DNA - 80 dias	3	12,17 ± 0,50	13,59 ± 0,50	11,7	25,6 ± 11,7
Scid não tratado - 80 dias	5	15,04 ± 0,38	16,72 ± 0,40	11,2	
<b>Comprimento da cauda (cm)</b>					
Salina - 40 dias	4	5,13 ± 0,20	5,80 ± 0,18	13,1	
hGH-DNA - 40 dias	3	5,13 ± 0,20	6,37 ± 0,30	24,2	39,3 ± 18,2
Scid não tratado - 40 dias	4	6,86 ± 0,10	7,26 ± 0,77	5,8	
Salina - 80 dias	4	5,97 ± 0,20	6,03 ± 0,18	1,0	
hGH-DNA - 80 dias	3	5,83 ± 0,20	6,53 ± 0,20	12,0	22,8 ± 9,7
Scid não tratado - 80 dias	5	7,32 ± 0,16	8,15 ± 0,17	11,3	
<b>Comprimento dos fêmures (mm)<sup>1</sup></b>					
Salina - 40 dias	4	—	9,96 ± 0,70	—	
hGH-DNA - 40 dias	3	—	11,82 ± 0,85	18,7 <sup>2</sup>	76,2 ± 36,4
Scid não tratado - 40 dias	4	—	12,36 ± 0,71	—	
Salina - 80 dias	4	—	10,00 ± 0,70	—	
hGH-DNA - 80 dias	4	—	11,61 ± 0,40	16,1 <sup>2</sup>	39,9 ± 10,4
Scid não tratado - 80 dias	6	—	14,04 ± 0,51	—	

<sup>1</sup>Considerando a média dos fêmures direito e esquerdo. <sup>2</sup>A porcentagem de aumento do fêmur foi calculada com base no comprimento do grupo salina de mesma idade. Todos os outros aumentos foram calculados a partir dos valores iniciais.

Análise estatística integrada baseada nos valores do <i>catch-up</i> do comprimento total do corpo, comprimento da cauda, fêmur direito e esquerdo e concentrações de mIGF-I				
Camundongos de 40 dias de idade		Camundongos de 80 dias de idade		Significância estatística
Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)	
58,91 ± 31,20	52,9	27,98 ± 15,33	54,8	P < 0,0002

Após a coleta de sangue, foram dissecados os fêmures direito e esquerdo. Como pode ser observado na Tabela 11, os fêmures direitos do grupo de camundongos jovens apresentaram uma porcentagem um pouco maior de crescimento em relação aos animais de 80 dias.

Além disso, não foi observada uma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os comprimentos médios dos fêmures direito e esquerdo de mesmo grupo tratado, o que sugere que houve um equilíbrio dos efeitos autócrinos/parácrinos da administração do hGH-DNA em ambos os músculos.

A análise estatística integrada dos valores de *catch-up* de todos os parâmetros de crescimento e mIGF-I dos camundongos tratados de 40 e 80 dias de idade (Tabela 10) confirma o pressuposto que o tratamento com camundongos mais jovens é mais eficiente, e neste caso, a diferença observada entre os grupos foi altamente significante ( $P < 0,0002$ ).

Após 15 e 60 dias de tratamento foram determinados os níveis de hGH e mIGF-I dos camundongos tratados e salina. Além dos níveis de mIGF-I dos camundongos *Scid* sem tratamento e de idade correspondente. Estes valores podem ser observados na Tabela 12.

Os níveis de hGH foram significativamente superiores ( $P < 0,0001$ ) para os dois grupos tratados em relação ao grupo salina após 60 dias de tratamento, porém estes valores não foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos tratados.

Os níveis de mIGF-I do grupo mais jovem tratado foram significativamente superiores aos do grupo controle, após 15 ( $P < 0,001$ ) e 60 dias ( $P < 0,001$ ) do início do tratamento.

Em relação aos valores dos grupos tratados de 40 e 80 dias no início do experimento, a diferença foi altamente significativa após 15 dias ( $P < 0,001$ ) da administração.

É importante ressaltar que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos níveis de mIGF-I obtidos nos camundongos tratados de 40 dias e dos *Scid* de mesma idade, após 15 dias de idade. O mesmo não foi observado nos camundongos tratados de 80 dias e *Scid* de mesma idade.

**Tabela 11:** Níveis de mIGF-I e hGH de camundongos *lit/scid*, após a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina, seguida de eletroporação, nos músculos tibiais anteriores direito e esquerdo, e de camundongos *Scid* sem tratamento

Tempo após a administração (dias)	40 dias de idade no início do tratamento						80 dias de idade no início do tratamento						
	Salina <i>lit/scid</i>			hGH-DNA <i>lit/scid</i>			<i>Scid</i> de mesma idade		hGH-DNA <i>lit/scid</i>			<i>Scid</i> de mesma idade	
	mIGF1 (ng/mL)	hGH	n	mIGF1 (ng/mL)	hGH	n	mIGF1 (ng/mL)	n	mIGF1 (ng/mL)	hGH	n	mIGF1 (ng/mL)	n
15	58,0 ± 0,0	----	2	250,0 ± 42,4	----	2	277,5 ± 127,3	6	74,7 ± 56,7	----	3	387,9 ± 36,8	6
60	39,5 ± 17,1	1,49 ± 1,18	4	215,0 ± 48,2	6,83 ± 1,61	3	403,40 ± 40,4	4	160,0 ± 39,4	6,67 ± 1,15	4	458,0 ± 35,7	6

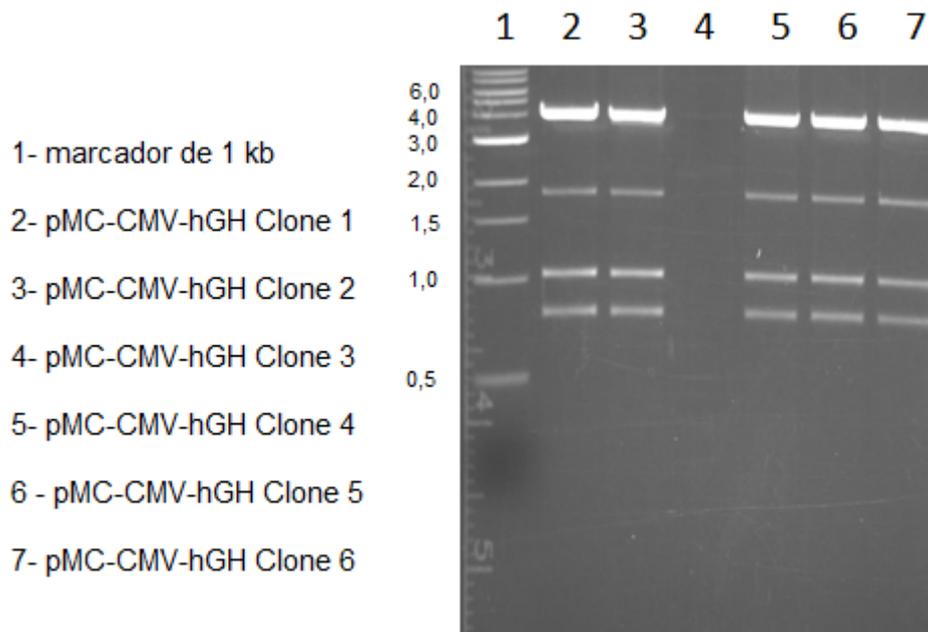
## 6.9 Clonagem e produção de minicírculos (MC de DNA)

Uma vez que na literatura são reportados resultados promissores com a utilização de MC de DNA na terapia gênica, foi realizado um estágio na Universidade de Aarhus - Dinamarca, durante 5 meses. O objetivo principal deste estágio foi a clonagem e produção de MC com os genes do hGH e mGH, visando aumentar a expressão das respectivas proteínas *in vivo*, utilizando o nosso protocolo de administração de DNA plasmidial, seguida de eletroporação.

### 6.9.1 Construção do plasmídeo pMC-CMV-hGH

O gene do hGH foi amplificado por reação de PCR e inserido no plasmídeo parental pMC-CMV por reação de ligase. A correta clonagem do gene sob o controle do promotor do CMV foi confirmada após análise de restrição com as enzimas *Not I* and *Nco I*. De acordo com a Fig. 16, todos os clones, com exceção do clone 3 estão corretos e apresentaram as bandas esperadas de 3.880, 1.011 e 782 pb. Uma quarta banda observada no gel é resultado de uma digestão parcial.

Os clones 1 e 2 foram sequenciados e a correta inserção do gene foi confirmada.



**Fig. 18:-** Análise de restrição de diferentes clones do pMC-CMV-hGH com as enzimas *Not I* e *Nco I*.

### 6.9.1.1 Produção de minicírculos MC-CMV-hGH

Após confirmação dos clones 1 e 2 por sequenciamento utilizando *primers* específicos, os MC foram produzidos a partir do plasmídeo parental, como descrito nos Métodos.

A produção dos minicírculos foi confirmada pelas análises de restrição (Fig. 17), que apresentaram as bandas nos tamanhos esperados, quando utilizadas as enzimas de restrição *Hind III* (1.734 bp) ou *Sac I* e *Mlu I* (1.144 and 590 bp).

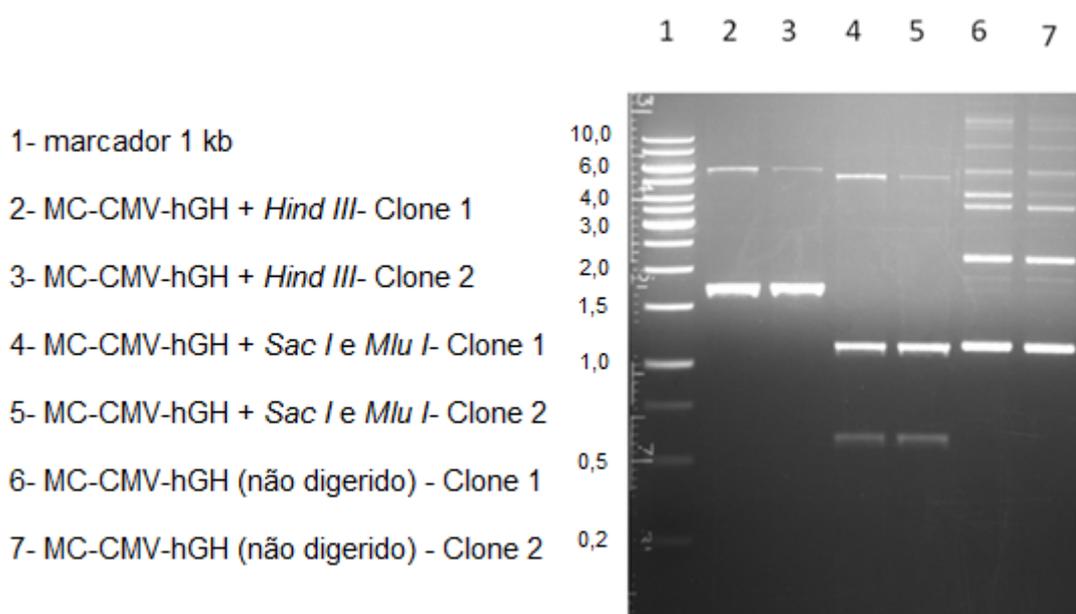
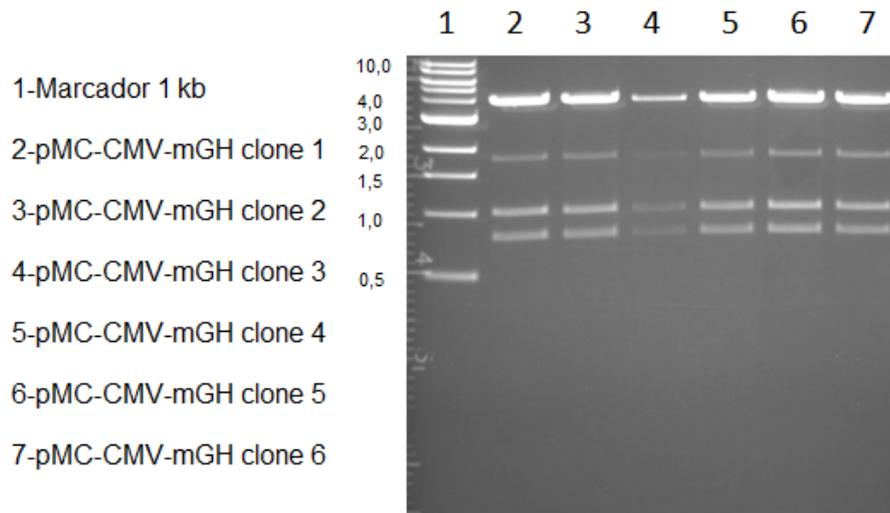


Fig. 19: Análise de restrição da produção do MC-CMV-hGH.

### 6.9.2 Construção do plasmídeo pMC-CMV-mGH

O gene do mGH foi amplificado por reação de PCR e também inserido no plasmídeo parental pMC-CMV por reação de ligase. A correta clonagem do gene do mGH, controlado pelo promotor do CMV foi confirmada após análise de restrição com as enzimas *Not I* and *Nco I*. De acordo com a Fig. 18, todos os clones estão corretos e apresentaram as bandas esperadas de 3.908, 1.012 e 786 pb. Uma quarta banda observada no gel é resultado de uma digestão parcial.

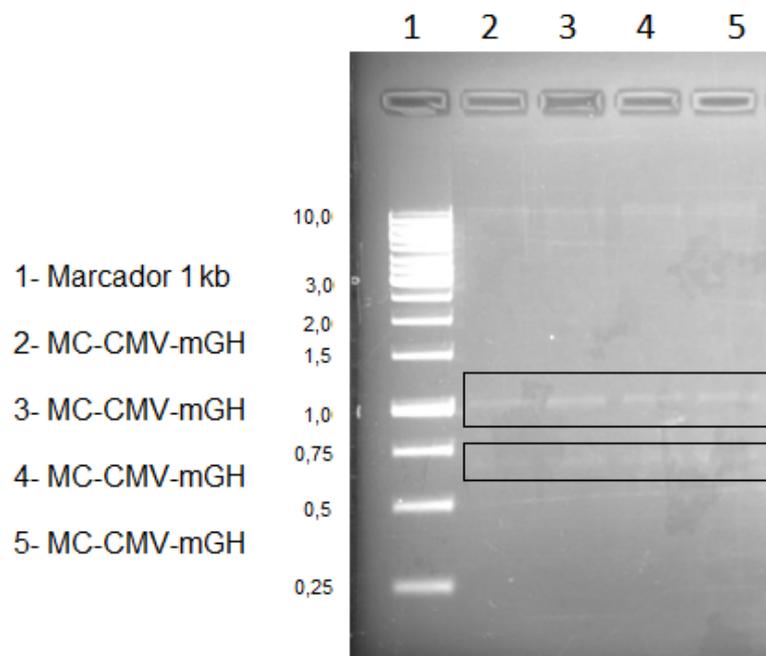
Os clones 5 e 6 foram sequenciados e confirmados quanto à correta inserção do gene.



**Fig. 20:** Análise de restrição do pMC-CMV-mGH com as enzimas *Not I* e *Nco I*.

### 6.9.2.2 Produção de minicírculos MC-CMV-mGH

A partir dos clones 5 e 6 confirmados por sequenciamento com *primers* específicos, os MC foram produzidos a partir do plasmídeo parental, seguindo protocolo descrito nos Métodos. A produção dos minicírculos foi confirmada por análise de restrição (Fig. 19), que apresentaram as bandas nos tamanhos esperados, quando utilizadas as enzimas *Xba I* e *Hind III* (1.070 e 661 pb).

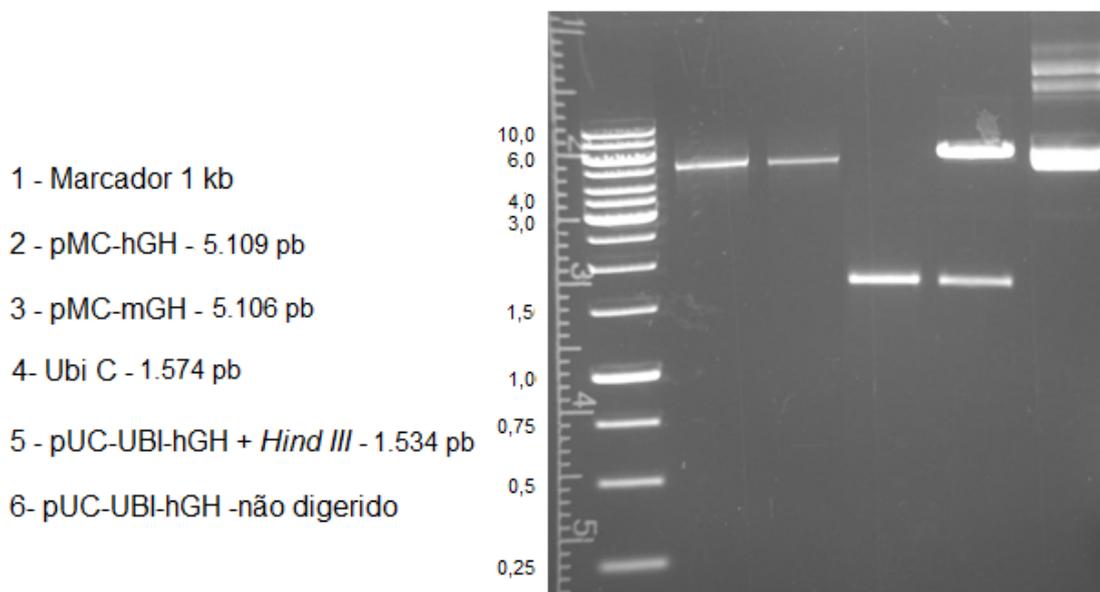


**Fig. 21:** Análise de restrição da produção de MC-CMV-mGH.

### 6.9.3 Alteração do promotor CMV pelo Ubi C nos plasmídeos parentais de MC

O promotor do CMV nos plasmídeos parentais dos MC foi trocado pelo da Ubiquitina C, uma vez que este promotor é considerado muito ativo na expressão de transgenes em diversas linhagens celulares (Schorpp et al., 1996).

O promotor Ubi C foi amplificado por PCR utilizando como fita molde o plasmídeo pUC-UBI-hGH, e o tamanho correto da sequência foi confirmada em gel de agarose a 1% (Fig. 20). Para certificar-se do tamanho correto da sequência correspondente à Ubi C (1.574 pb), foi realizada uma comparação com o plasmídeo molde, que após digestão com a enzima *Hind III*, origina uma banda de 1.534 pb. Neste gel também estão os plasmídeos parentais dos MC sem o promotor do CMV e previamente desfosforilados.

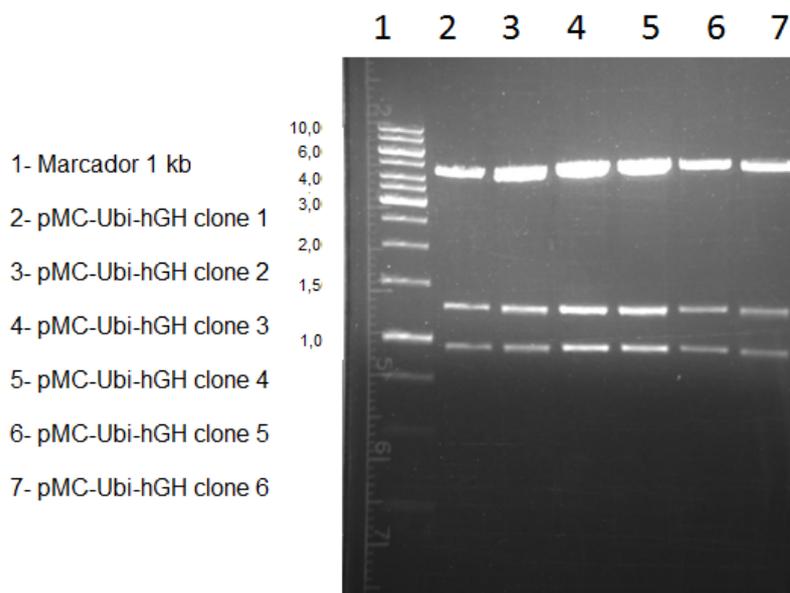


**Fig. 22:** Análise das sequências dos plasmídeos parentais e do promotor antes da ligação.

Após a confirmação do tamanho correto do promotor da Ubi C, este foi clonado nos plasmídeos parentais utilizando uma enzima de alta fidelidade (*High Fidelity*).

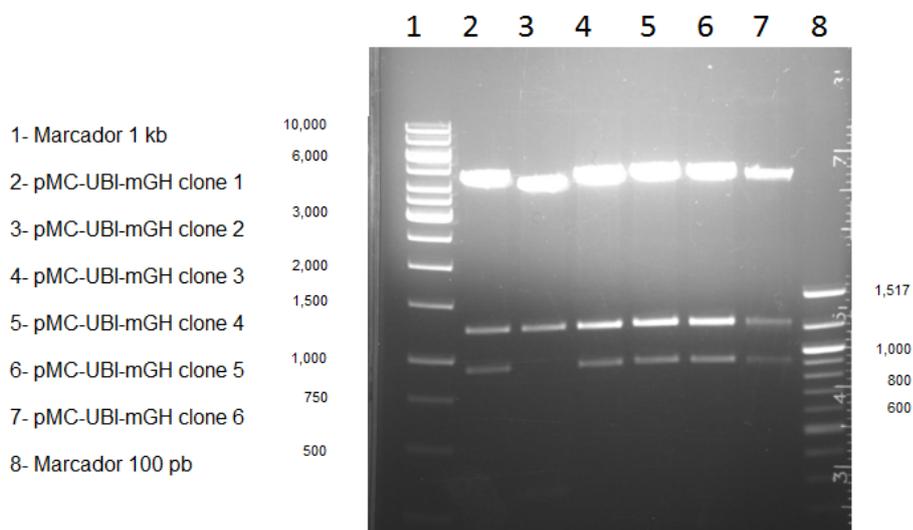
A construção do plasmídeo pMC-UBI-hGH (6.659 pb) foi confirmada após análise de restrição com as enzimas *Nco I* e *Dra III*. Todos os clones apresentaram

as bandas esperadas (4.477, 1.249 and 933 bp) que podem ser observadas na Fig. 21.



**Fig. 23:** Análise de restrição de diferentes clones do plasmídeo parental pMC-Ubi-hGH digerido com as enzimas *Nco I* e *Dra III*

A construção do plasmídeo pMC-Ubi-mGH foi confirmada por análise de restrição com as enzimas *Nco I* e *Dra III*. De acordo com a Fig. 22, todos os clones estão corretos, uma vez que foram observadas as bandas esperadas (4.477, 1.249 and 930 bp) após digestão. Os clones 3 e 4 foram confirmados após sequenciamento.

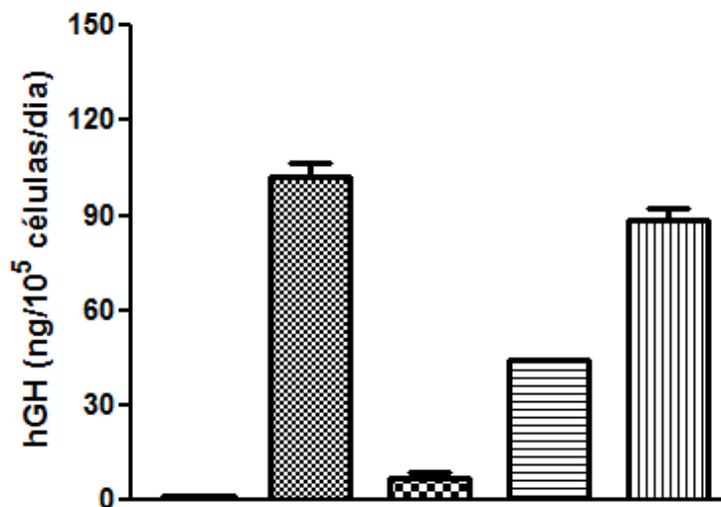


**Fig.24:** Análise da correta clonagem do plasmídeo parental pMC-Ubi-mGH, após digestão com *Nco I* e *Dra III*.

## 6.9.4 Transfecção de células HEK 293 com os minicírculos de DNA

### 6.9.4.1 Transfecção de células HEK 293 com os plasmídeos convencionais e MC contendo o gene do hGH

Células HEK 293 foram transfectadas com os plasmídeos convencionais (pUC-Ubi-hGH e pcDNA 3.1-hGH), utilizados como controle positivo (Oliveira et al., 2010), e com MC com o gene do hGH. As quantidades de hGH liberados no meio de cultura foram determinadas por RIA específico podem ser visualizadas na Fig. 23. Como pode ser observado, os níveis obtidos nos grupos transfectados com o promotor do Ubi C foram ~15x maiores para o grupo do plasmídeo controle. Porém no caso do promotor do CMV, os níveis foram 2x maiores para o grupo dos MC-CMV-hGH.

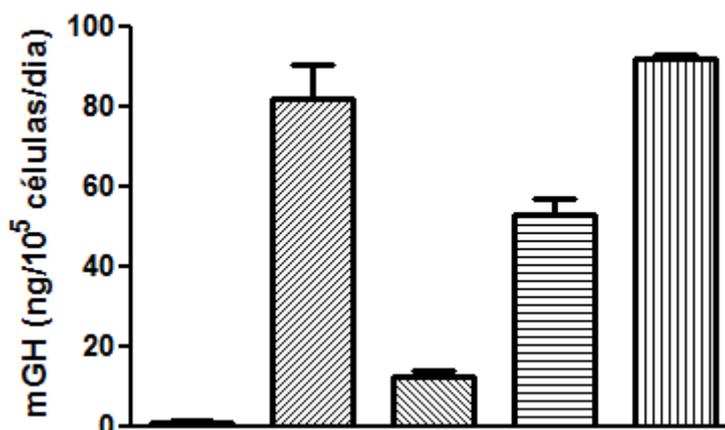


**Fig. 25:** Níveis de hGH obtidos de células HEK 293 não transfectadas (▨), e após a transfecção com plasmídeos contendo o gene deste hormônio: pUC-UBI-hGH (▩), MC-UBI-hGH (▧), pcDNA3.1 hGH (▤) e MC-CMV-hGH (▥).

### 6.9.4.2 Transfecção de células HEK 293 com o pMC-CMV-mGH e MC-CMV-mGH

As quantidades de mGH secretadas pelas células HEK 293 transfectadas com os MC de mGH e determinadas por ELISA específico são visualizadas na Fig. 24. Como controles positivos foram utilizados os plasmídeos convencionais pUC-Ubi-mGH e pcDNA-3.1-mGH (Oliveira, 2010). Os níveis obtidos no grupo transfectado com o plasmídeo pUC-UBI-mGH foram ~12x maiores em relação ao grupo dos MC-UBI-mGH. Porém no caso do grupo sob controle do promotor do CMV, os níveis de

hGH do grupo dos MC foram ~1,7x maiores que os obtidos após transfecção com o plasmídeo convencional.



**Fig. 26:** Níveis de mGH obtidos de células HEK 293 não transfectadas (▣) ou após a transfecção com os plasmídeos contendo o gene deste hormônio: pUC-UBI-mGH (▨), MC-UBI-mGH (▩), pcDNA3.1mGH (▭) e MC-CMV-mGH (▧).

## 7. DISCUSSÃO

A correção fenotípica total de camundongos anões tem sido reportada em diversos modelos animais por diferentes autores, utilizando a administração de vetores adenovirais e adenoassociados ou por transferência hidrodinâmica (Hahn et al., 1996; Marmary et al., 1999; Sondergaard et al., 2003; Sagazio et al., 2008).

A injeção hidrodinâmica consiste em uma transferência gênica promissora, que pode proporcionar níveis de expressão altos e estáveis do gene de interesse e devido à simplicidade da técnica, tem despertado o interesse de vários autores (Dagnaes-Hansen et al., 2002; Sondergaard et al., 2003; Suda; Liu, 2007). Porém este tipo de transferência não pode ser diretamente aplicada em humanos, uma vez que o alto volume de fluido e a alta velocidade, fundamentais para esta técnica, podem desregularizar a função cardíaca, levando à uma falência temporária deste órgão (Bonassa et al., 2011).

A proposta do nosso trabalho é que uma correção fenotípica similar poderia ser obtida após a administração plasmidial de DNA, seguida de eletroporação. Este método de transferência gênica pode ser bastante vantajoso, quando consideradas as seguintes características: habilidade de transferir transgenes de vários tamanhos (2 a 19 kb), baixa toxicidade e custo, simplicidade da técnica e a possibilidade de proporcionar altos níveis de expressão, mesmo após um única injeção ou a readministração do pDNA (Bloquel et al., 2004; Ratanamart; Shaw, 2006).

Embora a correção fenotípica para a DGH apresentada neste trabalho tenha sido parcial, a administração do plasmídeo contendo o gene do hGH sob o controle do promotor da Ubi C em camundongos anões e imunodeficientes (*lit/scid*) foi capaz de proporcionar elevadas porcentagens de aproximação de crescimento (*catch-up growth*) de 36-77%, em relação aos camundongos utilizados como controle positivo e não-deficientes de GH, dependendo dos parâmetros de crescimento analisados. Estes valores foram alcançados em consequência da utilização de camundongos mais jovens e da otimização das condições de eletroporação.

Um ponto positivo para a administração do hGH-DNA, seguida de eletroporação, é a evidente sobreposição das curvas dos camundongos *lit/scid* tratados e *Scid* controle positivo e sem tratamento, observada no experimento de

longa duração de 6 meses. Aparentemente ambos os grupos obtiveram o mesmo ganho absoluto de massa corpórea, apesar do peso inicial do grupo de camundongos *lit/scid* ter sido de ~9 g, enquanto o dos *Scid* sem tratamento foi de ~ 25 g.

Considerando que camundongos anões com a mutação *lit* são um modelo de deficiência isolada de GH do tipo 1B, no qual os níveis de GH são baixos em comparação aos dos camundongos não-deficientes de GH, mas podem ter seu crescimento estimulado por um GH exógeno ou transgene (Godfrey et al., 1993), a razão mais provável para a sobreposição das curvas e o aumento dos parâmetros de crescimento analisados é a expressão do gene do hGH administrado. Outro resultado que corrobora com este fato é o aumento dos níveis de hGH do grupo tratado com hGH-DNA que foram superiores aos do grupo controle com salina durante todos os 6 meses de tratamento.

Visto que a meia-vida circulatória do GH é curta, a determinação dos níveis de IGF-I tem sido bastante recomendada em resposta a tratamentos para a DGH em humanos. Este parâmetro é considerado como um eficiente marcador da atividade do GH no crescimento, pois possui uma considerável meia-vida circulatória, aparentemente não sofre variações diurnas e não é afetado por diversas influências como exercícios físicos, privação de nutrientes ou alterações nos níveis de glicose (Pawlikowska-Haddal et al., 2011).

Assim como o GH, os níveis de mIGF-I determinados no soro dos camundongos tratados foram significativamente superiores aos do grupo controle durante todos os 6 meses de tratamento, porém atingindo valores que foram aproximadamente duas vezes menores que os níveis dos camundongos *Scid* de mesma idade e sem tratamento. Uma completa normalização dos níveis de IGF-I foi descrita por Sondergaard et al. (2003) e Khamaisi et al., (2007), que reportaram valores de 400 - 600 ng/mL, enquanto os dos grupos controles foram inferiores a 100 ng/mL. Nestes dois trabalhos foi realizada a transferência gênica via injeção hidrodinâmica em camundongos hipofisectomizados.

A correção fenotípica e a normalização dos níveis de IGF-I foram também obtidas após a administração de um vetor adenoviral na veia caudal de camundongos *lit/lit*. O valor do grupo tratado foi de 238 ng IGF-I/mL e do grupo controle de 61 ng/mL (Hahn et al., 1996).

O gene do mGH quando transferido por intermédio de um vetor adenoviral em um modelo de camundongo de deficiência isolada de GH (GHRHKO), via

administração intraperitoneal, proporcionou uma normalização do peso corpóreo e dos níveis de IGF-I (Sagazio et al., 2008). Por outro lado, foi obtida em outro trabalho do mesmo grupo, utilizando o mesmo vetor e modelo animal, via injeção no quadríceps direito, somente uma correção fenotípica parcial, com níveis de IGF-I da ordem de 90 ng/mL, não significativamente diferentes do grupo controle (Martari et al., 2009)

Khan et al. (2010) obtiveram altos níveis de IGF-I após a administração de um plasmídeo contendo o gene do hormônio liberador do GH em porcos jovens, porém não há descrição na literatura de uma normalização do IGF-I em camundongos anões utilizando um vetor de origem não-viral e administração intramuscular.

A correlação positiva entre a idade e os níveis de mIGF-I também é encontrada em camundongos não-deficientes de GH (*lit/+*), confirmando os dados do *Jackson Laboratories*, onde foram obtidos níveis de ~100 ng/mL em camundongos de uma semana e de ~550 ng/mL após 8 semanas de idade (Donahue et al., 1993).

Uma das possíveis limitações no aumento dos níveis de GH, mIGF-I e consequentemente dos parâmetros de crescimento poderia estar relacionada à idade dos camundongos *lit/scid* no início do tratamento, que era de 80 dias de idade, fase que corresponde à idade adulta. Courtland et al. (2011) descrevem que durante a fase pubertal, que corresponde de 4 a 8 semanas em camundongos, as mudanças corporais e no comprimento dos ossos ocorrem mais rapidamente.

Os parâmetros de crescimento utilizados em conjunto com a determinação do GH e IGF-I, como o comprimento total do corpo, da cauda e dos fêmures mostraram uma alta precisão e uma pequena variação, quando comparados com o aumento do peso corpóreo. Este último pode ser considerado como o mais variável em razão de dois fatores: erro no procedimento de pesagem e variações fisiológicas.

O parâmetro mais preciso foi o aumento do comprimento dos fêmures, principalmente quando considerado que este osso não apresenta um aumento após a fase pubertal.

Com base nestas informações e na tentativa de obter incrementos maiores dos parâmetros de crescimento, foram realizados bioensaios de aproximadamente 30 dias, comparando os efeitos após a administração do hGH-DNA em camundongos de 80, 60 e 40 dias de idade no início do tratamento.

Dependendo do parâmetro de crescimento analisado, foram obtidos valores de *catch-up* de 36-77% em camundongos de 40 dias de idade, com uma melhor correção no comprimento dos fêmures.

Neste trabalho, as medidas iniciais dos comprimentos dos fêmures foram obtidas de *lit/scid* e *Scid* sem tratamento, que foram eutanasiados e tiveram os fêmures dissecados. Porém a precisão na avaliação do aumento do comprimento é menor, uma vez que não foram determinados os comprimentos dos mesmos camundongos no início e final dos experimentos. Em uma metodologia recentemente padronizada em nosso laboratório, onde pôde ser realizada a medição por radiografia do tamanho dos fêmures dos mesmos camundongos no início e no final do tratamento, houve um aumento da precisão deste parâmetro (Cecchi et al., manuscrito em preparação).

Para confirmar a importância da idade no início do tratamento, foi realizada uma análise estatística integrada dos valores de *catch-up*, calculados para cada parâmetro de crescimento analisado. Foi obtida uma alta e significativa diferença ( $P < 0,0002$ ) entre o *catch-up* dos fêmures de todas as outras medidas físicas, confirmando um notável efeito osteogênico do GH.

Danko et al. (1997) observaram que a administração direta de um plasmídeo com o gene da luciferase, no músculo de camundongos, foi muito mais eficiente com expressão até 120 ou 1.200 vezes maiores em camundongos de 2 semanas de idade, quando utilizados camundongos de 8 ou 20 semanas de idade, respectivamente. Porém quando foi realizada uma administração em camundongos recém-nascidos, foi obtida uma baixa expressão do gene, o que foi relacionado com o volume do fluido da injeção, que não pôde ser absorvido devido ao reduzido tamanho do músculo.

A administração de DNA plasmidial em camundongos jovens pode ser favorável no músculo em razão de uma menor quantidade de matriz celular e melhor distribuição do plasmídeo nas fibras musculares, aumentando as chances de incorporação do DNA pela célula e obtendo conseqüentemente uma maior expressão do transgene (Wells; Goldspink, 1992; Mc Mahon et al., 2001; Wang et al., 2013). Apesar disso, alguns autores afirmam que estes tipos de influência em camundongos só ocorrem em administrações diretas sem eletroporação (Gollins et al., 2003; Mc Mahon; Wells, 2004).

A combinação de um pulso curto e de alta voltagem (800 V/cm e 100 $\mu$ s), seguido por um pulso longo e de baixa voltagem (100 V/cm e 400 ms) têm sido

descrita em diversos trabalhos como sendo mais efetivo na incorporação do plasmídeo pela células musculares do músculo tibialis anterior sem exposição, e com efeitos adversos mínimos (Bureau et al., 2000; Hojman P et al., 2007; Satkauskas, et al., 2002).

Um dos pontos positivos que pode ser enfatizado neste trabalho, relacionado com a administração do hGH-DNA, é a mudança na metodologia. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, as administrações foram realizadas com a exposição do músculo quadríceps, além da utilização de um volume maior de hialuronidase ou de DNA diluído em salina (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014).

As mudanças na idade inicial, do músculo, dos volumes de injeção e dos parâmetros de eletroporação apresentados neste trabalho foram capazes de proporcionar pela primeira vez, em uma situação específica, níveis normais de IGF-I quando comparados aos dos camundongos *Scid* e sem tratamento.

Os minicírculos de DNA com os genes do hGH e mGH, sob controle do promotor do CMV, forneceram uma maior expressão *in vitro* em células HEK 293, após 3 dias da transfecção, em relação ao plasmídeo convencional, com o mesmo promotor. Embora o mesmo não tenha acontecido com os MC sob controle da Ubi C, um aumento dos níveis da proteína poderia ser esperado após um tempo maior da transfecção, uma vez que Morrissey et al., (2013) compararam a expressão *in vivo* de dois plasmídeos, ambos com o gene da luciferase, um com o promotor do CMV e outro sob o comando da Ubi C. Observaram inicialmente uma maior expressão de luciferase no grupo sob controle do CMV, mas seguida de uma queda a níveis basais após 7 dias. Enquanto isso, embora a expressão inicial do grupo tratado com o plasmídeo com o promotor da Ubi, tenha sido menor, aumentou após 7 dias e permaneceu maior que os níveis do grupo com o CMV após 25 dias.

Para um futuro sucesso deste tipo de terapia gênica neste modelo de deficiência de GH e visando um protocolo pré-clínico em humanos, é imprescindível obter níveis altos e duradouros de GH e IGF-I que propiciem uma correção fenotípica total do modelo de deficiência de GH. Outro aspecto importante a ser considerado é a otimização de uma administração eficiente, na qual não seja necessária a utilização prévia de hialuronidase, o que não foi possível ser alcançado neste trabalho.

## 8. CONCLUSÃO

- Ao final do experimento de longa duração (6 meses) e após 3 administrações do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguidas de eletroporação, em camundongos *lit/scid*, foi obtido um aumento de peso corpóreo de ~50% ( $P < 0,001$ ) em relação ao peso inicial. Para o comprimento do corpo, foi obtido um aumento final de 16,4% e *catch-up* em relação aos *wild type (Scid)* de 21,0%; para a cauda o aumento foi de 16,4% e o *catch-up* de 18,6%; uma porcentagem de aumento do fêmur direito do grupo tratado em relação ao controle de 28,3% e *catch-up* de 60,4% e do fêmur esquerdo um aumento final de 24,5% e *catch-up* de 52,7%.
- Os órgãos do grupo tratado com DNA plasmidial que apresentaram as maiores porcentagens de crescimento em relação ao grupo *Scid*, desde o primeiro mês de experimento foram: músculo quadríceps direito, rins direito e esquerdo, baço e fígado. Por ser o local da primeira administração, o aumento do músculo quadríceps direito deve estar relacionado aos efeitos autócrinos/parácrinos do hGH-DNA. O aumento do baço pode ser em razão de uma resposta inflamatória à cirurgia, uma vez que o mesmo aumento também ocorreu no grupo tratado com salina. E para o fígado, por ser o principal órgão-alvo e produtor de mIGF-I, é esperado que apresente uma das maiores porcentagens de crescimento.
- Os níveis de mIGF-I do grupo tratado com DNA plasmidial foram significativamente superiores em relação ao grupo salina, após 1 ( $P < 0,01$ ), 2 ( $P < 0,001$ ), 3 ( $P < 0,001$ ), 5 ( $P < 0,01$ ) e 6 ( $P < 0,001$ ) meses de tratamento.
- Uma vez que os níveis de glicose do grupo tratado com hGH-DNA não apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo controle e dos camundongos *Scid* durante todo o tratamento, podemos sugerir que o modelo de terapia gênica proposta para a DGH apresenta-se potencialmente seguro, por manter sob controle os níveis glicêmicos dos camundongos tratados.
- A utilização de diferentes quantidades de DNA plasmidial não apresentou diferença significativa nos níveis plasmáticos de mIGF-I, quando administrado o dobro da quantidade utilizada atualmente em nosso protocolo experimental.

- Nos experimentos utilizando camundongos de diferentes idades no início do tratamento, foi observado um aumento maior de todos os parâmetros de crescimento avaliados dos camundongos mais novos em relação aos mais velhos. Com base nestes resultados, podemos afirmar que este tipo de terapia gênica é mais eficiente em camundongos mais jovens, uma vez que os aumentos obtidos, após 1 mês de tratamento em camundongos de 40 dias, são comparáveis aos obtidos no experimento de longa duração de 6 meses, após 3 administrações do plasmídeo, onde foram utilizados camundongos de  $\pm$  80 dias.
- No experimento utilizando diferentes parâmetros de eletrotransferência, após a administração do hGH-DNA em diferentes músculos, foram observados os maiores níveis de hGH no soro dos camundongos dos grupos tratados no músculo quadríceps com exposição e também no músculo tibial anterior sem exposição, seguidos de eletrotransferência, utilizando um pulso alto e curto e um pulso baixo e de longa duração (HV/LV). Este tipo de eletrotransferência é interessante, pois o primeiro pulso auxilia na permeabilização celular e o segundo no transporte eletroforético do DNA através da membrana.
- Foi testado o músculo tibial anterior (TA) por ser muito utilizado atualmente em diferentes protocolos de administração de DNA plasmidial, seguido de eletroporação, uma vez que este músculo também é capaz de produzir e secretar a proteína de interesse após longos períodos da eletro-gene transferência. Além disso não há a necessidade de exposição deste músculo para este tipo de transferência, o que seria ideal, visando um protocolo clínico experimental (Murakami and Sunada, 2011).
- Pela primeira vez, utilizando um grupo de camundongos jovens de 40 dias de idade e tratados com hGH-DNA no músculo tibial anterior, sem exposição, seguido de eletroporação utilizando um pulso alto e um baixo, foi obtido uma porcentagem de recuperação em relação aos camundongos *Scid* de ~35,5% do comprimento total do corpo, de ~39,3% do comprimento da cauda e de ~76% do comprimento dos fêmures. Além disso foram obtidos níveis de IGF-I comparáveis aos dos camundongos *Scid* após 15 dias da administração. Os mesmos incrementos não foram observados no grupo tratado de 80 dias.

- Os minicírculos de DNA, com os genes do hGH e mGH sob o controle do promotor do CMV foram capazes de proporcionar uma maior expressão *in vitro* em células HEK 293, em relação aos plasmídeos convencionais.
- Os principais resultados deste trabalho foram publicados no artigo “*Partial correction of the dwarf phenotype by non-viral transfer of the growth hormone gene in mice: treatment age is critical*”, na revista *Growth hormone & IGF research*, volume 26, p. 1-7, 2016.

## 9. REFERÊNCIAS

1. AIHARA, H.; MIYAZAKI, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. **Nature Biotechnol.**, v. 9, p. 867-870, 1998.
2. ALATZOGLOU, K.S.; DATTANI, M. T. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency – an update. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 6, p. 562 - 576, 2010.
3. APPLIED CLINICAL TRIALS. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em: <<http://www.appliedclinicaltrials.com/human-gene-transfer-research-what-clinical-research-professionals-need-know?pageID=2>>. Acesso em 11/11/2015.
4. BANK, P.; AHMED, S.F.; ARGENTE, J.; BACKELJAUW, P.; BETTENDORF, M.; BONA, G.; COUTANT, T.; ROSENFELD, R. G.; WALENKAMP, M. J.; SAVAGE, M. O. Identification and management of poor response to growth-promoting therapy in children with short-stature. **Clin. Endocrinol.** v. 77, p. 169 - 81, 2012.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. BIGEY, P.; BUREAU, M. F.; SCHERMAN, D. In vivo plasmid DNA electrotransfer. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 443 - 447, 2002.
9. BLIZZARD, R. M. History of growth hormone therapy. **Indian J. Pediatr.**, v. 1, p. 87 - 91, 2012.
10. 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.
11. BODLES-BRAKHOP, A.M.; HELLER, R.; DRAGHIA-AKLI R. Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. **Mol. Ther.**, v. 17, p. 585 - 592, 2009.
12. BOGUSZEWSKI, C. L. Genética molecular do eixo GH-IGF-I. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, p. 5 -14, 2001.
13. BONASSA, B.; HAI, L.; LIU, D. Hydrodynamic gene delivery and Its applications in pharmaceutical research. **Pharm. Res.** v. 4, p. 694 - 701, 2011.
14. BRAUN, S. Muscular gene transfer using nonviral vectors. **Curr. Gene Ther.**, v. 8, p. 391 - 405, 2008.
15. BUREAU M. F.; GEHL J.; DELEUZE V.; MIR L. M.; SCHERMAN D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1474, p. 353 - 359, 2000.

16. CÁZARES-DELGADILLO, J.; GANEM-RONDERO, A.; KALIA, Y. N. Human growth hormone: new delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 2, p. 278 - 288, 2011.
17. CECCHI, C. R. **Obtenção de um modelo homólogo de terapia gênica mediante administração direta de um plasmídeo com o gene do hormônio de crescimento murino em camundongos anões imunocompetentes**, 2013, 67 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
18. CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, N.A.J.; LIMA, E. R.; JAKOBSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; GISSEL, H.; AAGAARD, L.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A. L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. A Novel Homologous Model For Gene Therapy of Dwarfism by Non-Viral Transfer of The Mouse Growth Hormone Gene Into Immunocompetent Dwarf Mice. *Curr. Gene Ther.*, v.14, p. 44 - 51, 2014.
19. CHABOT, S.; ORIO, J.; SCHMEER, M.; GOLZIO, M.; TESSIÉ, J. Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery. *Gene Ther.* v. 20, p. 62 - 68, 2013.
20. COOK, D.M.; ROSE, S.R. A review of guidelines for use of growth hormone in pediatric and transition patients. *Pituitary*, v. 15, p. 301 - 310, 2012.
21. COURTLAND, H.; SUN, H.; BETH-ON, M.; WU, Y.; ELIS, S.; ROSEN, C. J.; YAKAR, S. Growth hormone mediates pubertal skeletal development independent of hepatic IGF-1 production. *J. Bone Miner. Res.*, v. 26, p. 761-768, 2011.
22. 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 hydrodynamic gene transfer of a plasmid vector containing the human ubiquitin promoter. *J. Mol.*, v. 80, p. 665 - 670, 2002.

23. DANKO, I.; WILLIAMS, P.; HERWEIJER, H.; ZHANG, G.; LATENDRESSE, J. S.; BOCK, I.; WOLFF, J. A. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet.* v. 6, p. 1435 - 1443, 1997
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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. Endocrinol.*, v. 139, p. 431 - 439, 1993.
28. 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.
29. GASPAR, V.; MELO-DIOGO, D.; COSTA, E.; MOREIRA, A.; QUEIROZ, J.; PICHON, C.; CORREIA, I.; SOUSA F. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* v. 3, p. 353 - 379, 2015.
30. GILL, G.R.; PRINGLE, I. A.; HYDE, S.C. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Ther.*, v.16, p. 165 - 171, 2009.

31. GLEZER, A.; SOARES, C. R.; VIEIRA, J. G.; GIANNELLA-NETO, D.; RIBELA, M. T.; GOFFIN, V.; BRONSTEIN, M. D. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 91, p. 1048 - 1055, 2006.
32. GODFREY, P.; RAHAL, J. O.; BEAMER, W. G.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; MAYO, K. E. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. **Nat. Genet.** v. 3, p. 227 - 232, 1993.
33. 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.
34. GOLLINS, H.; MCMAHON, J.; WELLS, KE.; WELLS, DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. **Gene Therapy**, v. 10, p. 504 - 512, 2003.
35. GOTHELF, A.; GEHL, J. Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. **Curr. Gene Ther.** v. 10, p. 287 - 99, 2010.
36. 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.
37. 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.

38. HAHN, T.M.; COPELAND, K.C.; WOO, S.L.C. Phenotypic correction of dwarfism by constitutive expression of growth hormone. *Endocrinology*, v.137 p.4988 - 4993, 1996.
39. HIGUTI, E.; CECCHI, C. R.; OLIVEIRA, N. A. J.; VIEIRA, D. P.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A. L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. Growth responses following a single intra-muscular hGH plasmid administration compared to daily injections of hGH in dwarf mice. *Curr. Gene Ther.*, v. 12, p . 437 – 443, 2012.
40. HIGUTI, E.; CECCHI, C. R.; OLIVEIRA, N. A. J.; LIMA, E. R.; VIEIRA, D. P.; AAGAARD, L.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A. L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. Partial correction of the dwarf phenotype by non-viral transfer of the growth hormone gene in mice: treatment age is critical. *Growth Horm. IGF Res.*, v. 26, p. 1 - 7, 2016.
41. HOJMAN, P.; GISSEL, H.; GEHL, J. Sensitive and precise regulation of haemoglobin after gene transfer of erythropoietin to muscle tissue using electroporation. *Gene Ther.* v. 14, p. 950 - 959, 2007.
42. HUANG SU, C.; JER WU, Y.; HSIAO WANG, H.; YEH, H. Non-viral gene therapy targeting cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.* , v. 303, p. H629 - H638, 2012.
43. KAJI, E. H.; LEIDEN J. M. Gene and stem cell therapies. *Jama.*, v. 285, p. 545 - 550, 2001.
44. KEENEY, M.; ONG, S.; PADILLA, A.; YAO, Z.; GOODMAN, S.; WU, J.C.; YANG, F. Development of poli ( $\beta$ -amino ester) - based biodegradable nanoparticles for nonviral delivery of minicircle DNA. *A.C.S. Nano.*, v. 8, p. 7241 - 7250, 2013.

45. 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.
46. KEMP, S. Growth hormone deficiency. **eMedicineSpecialties**. Arkansas, Maio 2010. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/923688-print>>. Acesso em 06 dez. 2010.
47. KAY, M. A.; HE, C.; CHEN, Z. A simple and rapid minicircle DNA vector manufacturing system. **Nat. Biotechnol.** v. 12, p. 1287 – 1289, 2010.
48. KAY, M. A., State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 316 - 328, 2011.
49. 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. 18, p. 327 - 333, 2010.
50. 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.
51. LANNING, N. J.; CARTER-SU, C. Recent advances in growth hormone signaling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 4, p. 225 - 235, 2007.
52. LE ROITH, D. The insulin-like growth factor system. **Experimental Diab. Res.**, v. 4, p. 205 – 212, 2003.

53. LE ROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J.; BUTLER, A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.*, v. 22, p. 53 - 74, 2001.
54. LIU, J.; LE ROITH, D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocr. Rev.*, v. 140, p. 5178 - 5184, 1999.
55. MC MAHON, J.M. ; WELLS, D.J. Electroporation for gene transfer to skeletal muscles. *Biodrugs*, v. 18, p. 155-165, 2004.
56. MC MAHON, 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.
57. MARMARY Y.; PARLOW, A.F.; GOLDSMITH, C.M.; HE, X.; WELLNER, R.B.; SATOMURA, K.; KRIETE, M.F.; ROBEY, P.G.; NIEMAN, L.K.; AND BAUM, B.J. Construction and in vivo efficacy of a replication-deficient recombinant adenovirus encoding murine growth hormone. *Endocrinology*, v. 140, p. 260 - 265, 1999.
58. MARTARI, M.; SAGAZIO, A.; MOHAMADI, A.; NGUYEN, Q.; HAUSCHKA, S. D.; KIM, E.; SALVATORI, R., Partial rescue of growth failure in growth hormone (GH)-deficient mice by a single injection of a double-stranded adeno-associated viral vector expressing the GH gene driven by a muscle-specific regulatory cassette. *Hum. Gene Ther.*, v. 20, p. 759 - 766, 2010.
59. MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. M. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, USA. p. 943 - 948, 2011.
60. 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.

61. MIYAZAKI, S.; MIYAZAKI J. In vivo electrotransfer into muscle. *Develop. Growth Differ.*, v. 50, p. 479 - 483, 2008.
62. MOLITCH, M.E.; CLEMMONS, D.R.; MALOZOWSKI, S.; MERRIAN, G.R.; VANCE M.L. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 96, p.1587 - 609, 2011.
63. 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.
64. MORRISSEY, D.; COLLINS, S. A.; RAJENDERAN, S.; CASEY, G.; O'SULLIVAN, G. C.; TANGNEY, M. Plasmid Transgene Expression in vivo: Promoter and Tissue Variables. In: *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, MARTIN, F. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/plasmid-transgene-expression-in-vivo-promoter-and-tissue-variables>> (Acesso em 12 de dezembro de 2015).
65. MURAKAMI, T.; SUNADA, Y. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Curr. Gene Ther.*, v. 6, p. 447-56, 2011.
66. NAYEROSSADAT, N.; MAEDEH, T.; ALI, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* v.1:27, p. 1 - 11, 2012.
67. 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 periplasmic space. *J. Chromat. A*, v. 852, p. 441 - 450, 1999.

68. 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.
69. OSBORN, M.J.; MCELMURRY, R.T.; LEES, C.J.; DEFEO, A.P.; CHEN, Z-Y.; KAY, M.A.; NALDINI, L.; FREEMAN, G.; TOLAR, J.; BLAZAR, B.R. Minicircle DNA-based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of  $\alpha$ -L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I. **Mol. Ther.**, v. 3, p. 450 - 460, 2010.
70. PAWLIKOWSKA-HADDAL, A., COHEN, P., COOK, D. M. How useful are serum IGF-I measurements for managing GH replacement therapy in adults and children? **Sprin. Scien.+ Bus. Med.** v. 15, p. 126-134, 2011.
71. PERONI, C.N., GOUT, P.W., BARTOLINI, P. Animal models for growth hormone gene therapy. **Curr. Gene Ther.**, v. 5, p. 493-509, 2005.
72. 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.**, v. 52/5, p. 854-860, 2008.
73. PROYETO BIOSFERA. Representação das metodologias de transferência gênica. Disponível em: <<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/genetica/contenido14.htm>>. Acesso em 15/11/2015.
74. PRUD'HOMME G.J.; DRAGHIA-AKLI R.; WANG Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. **Gene Ther.**, v. 14, p. 553 - 64, 2007.
75. RAMAMOORTH M.; NARVEKAR A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 9, p. GE01- GE06, 2015.

76. RATANAMART, J.; SHAW, J.A.M. Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy of circulating therapeutic protein replacement: a tale of the tortoise and the hare? **Curr. Gene Ther.**, v. 6, p. 1 -17, 2006.
77. 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.
78. ROCHA, M.G.; MARCHISOTTI, F.G.; OSÓRIO, M.G.; MARUI, S. High prevalence of pituitary magnetic resonance abnormalities and gene mutations in a cohort of Brazilian children with growth hormone deficiency and response to treatment. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.** v 21, p. 673 - 80, 2008.
79. SAGAZIO, A.; XIAO, X.; WANG, Z.; MARTARI, M.; SALVATORI, R. A single injection of double-stranded adeno-associated viral vector expressing GH normalizes growth in GH-deficient mice. **J. Endocrinol.**, v. 196, p. 79 - 88, 2008.
80. SALVATORI, R. Growth hormone and IGF-I. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 5, p. 15-23, 2004.
81. SATKAUSKAS S.; BUREAU M. F.; PUC M.; MAHFOUDI A.; SCHERMAN D.; MIKLAVCIC D. Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. **Mol. Ther.** v.5, p.133 - 140, 2002.
82. SCHMIDT-WOLF, G. D.; SCHMIDT-WOLF, I. G. H. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. **Trends Mol. Med.**, v. 9, p. 67 - 72, 2003.
83. SCHORPP, M.; JAGER, R.; SCHELLANDER, K.; SCHENKEL, J.; WAGNER, E. F.; WEIHER, H.; ANGEL, P. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. **Nucl. Acid. Res.** v. 24, p. 1787 - 1788, 1996.

84. SEGRE, G. V.; BROWN, E. N. Measurement of hormones. **Williams Textbook of Endocrinology**. p. 44 - 45, 1998.
85. SHOJI M.; KATAYAMA K.; TACHIBANA M.; TOMITA, K.; SAKURAI, F.; KAWABATA, K.; MIZUGUCHI, H. Intramuscular DNA immunization with in vivo electroporation induces antigen-specific cellular and humoral immune responses in both systemic and gut-mucosal compartments. **Vaccine**, v. 30, p. 7278 - 85, 2012.
86. 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. 427 - 432, 2003.
87. UNISCIENCE. Esquema da produção de minicírculos de DNA. Disponível em:< <http://www.uniscience.com/vetores/minicircle-technology-sbi>>. Acesso em: 12/12/2015.
88. WANG, J.; ZHOU, J.; CHENG, C. M.; KOPCHICK, J. J., BONDY, C. A. Evidence supporting dual, IGF-I – independent and IGF-I – dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. **Jornal of Endocrinology.**, v. 180, p. 247 - 255, 2004.
89. Wang, W.; Li, W.; Ma, N.; Steinhoff, G. Non-viral gene delivery methods. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 14, p. 46 - 60, 2013.
90. WELLS, D.J.; GOLDSPINK, G. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. **FEBS.**, v. 306, p. 203 - 205, 1992.

91. 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.