



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS ANIMAIS DE TERAPIA GÊNICA PARA O
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO UTILIZANDO QUERATINÓCITOS
TRANSDUZIDOS E INJEÇÃO DIRETA DE DNA PLASMIDIAL**

Nélio Alessandro de Jesus Oliveira

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
2010

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS ANIMAIS DE TERAPIA
GÊNICA PARA O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO UTILIZANDO
QUERATINÓCITOS TRANSDUZIDOS E INJEÇÃO DIRETA DE
DNA PLASMIDIAL**

Nélio Alessandro de Jesus Oliveira

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

Orientadora: Dra. Cibele Nunes Peroni

São Paulo

2010

Aos meus pais Hélio e Lourdes, por todo amor e dedicação, e pelo exemplo de vida.

A minha amada esposa Vanessa, pelo seu amor, incentivo, companheirismo e compreensão.

Agradecimentos

Agradeço em especial à minha orientadora e mestra Dra. Cibele Nunes Peroni, pela oportunidade, orientação, confiança e amizade tão importantes para a minha formação profissional e humana.

Ao Dr. Paolo Bartolini, meu “co-orientador”, pela amizade, incentivo e apoio em todas as fases deste projeto.

Ao Dr. Carlos R. J. Soares e à Dra. Maria Teresa Ribela, pela amizade e incentivo.

À Claudia Cecchi e à Eliza Higuti pela ajuda na realização dos experimentos e pelos ensinamentos.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia do IPEN pela ajuda e apoio: Arlete, Beatriz, Cristiane, Dona Dirce, Edna, Fernanda, Geyza, Kayo, Herbert, Johnny, José Maria, Juliana, Junqueira, Maurício, Míriam, Marcos, Néia, Neide, Renata, Rosângela, Susana e Taís.

Ao meu irmão Diego, pelo carinho, amizade, apoio e torcida.

À Elizabeth, ao Carlos e ao Hélio, do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN), pela disponibilidade para as irradiações das células.

Ao Dr. Alysson Renato Muotri, pela colaboração, amizade, idéias e estímulos que foram essenciais durante a minha estadia em seu laboratório na *University of California San Diego*.

Aos colegas Alan, Alex, Apuã, Charlie, Cassiano, Earl, Katlin, Kristin, Luciana, Miguel e Yanelli, pela amizade, companheirismo e por tornar divertida a minha estadia em San Diego.

Ao Dr. Carlos Maranduba pela amizade e ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram para este sonho, meu muitíssimo obrigado.

Invictus

*Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.*

William Ernest Henley

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS ANIMAIS DE TERAPIA GÊNICA PARA O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO UTILIZANDO QUERATINÓCITOS TRANSDUZIDOS E INJEÇÃO DIRETA DE DNA PLASMIDIAL

Nélio Alessandro de Jesus Oliveira

RESUMO

Queratinócitos são células bastante atrativas para a transferência gênica *ex vivo* e liberação sistêmica, uma vez que as proteínas secretadas por estas células podem atingir a circulação via um mecanismo similar ao processo natural. No presente trabalho, queratinócitos transduzidos mediante um vetor retroviral com o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) foram submetidos a um tratamento de aderência ao colágeno e à análise clonal, com o intuito de enriquecer esta população de queratinócitos em células-tronco. O principal resultado foi um aumento da viabilidade celular *in vitro* dos queratinócitos tratados, que poderá se refletir num aumento da durabilidade da secreção do hormônio *in vivo*, quando realizado o implante de culturas organotípicas em camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*).

Foi também utilizado um modelo de terapia gênica *in vivo*, baseado na eletrotransferência de DNA plasmidial (*naked DNA*), contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH), no músculo quadríceps de camundongos anões (*lit/lit*) e anões imunodeficientes (*lit/scid*). Foram padronizadas as condições de eletroporação em 8 pulsos de 50 V e 20 ms com 0,5 s de intervalo, utilizando um plasmídeo com o promotor da ubiquitina C e a sequência genômica do hGH. A administração de uma dose única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH em camundongos *lit/scid*, seguida de eletroporação, propiciou pela primeira vez na literatura obtenção de níveis sustentáveis na circulação de 1,5-3,0 ng hGH/ml, durante 60 dias. Esses animais tratados com DNA apresentaram um aumento de peso altamente significativo ($P < 0,001$) de 33,1%, comparado a uma perda de peso, não significativa, no grupo controle (camundongos injetados com salina + eletroporação). Os músculos quadríceps dos animais tratados apresentaram um aumento de 48%, quando comparados aos dos animais do grupo controle ($P < 0,001$). Outro estudo de eletrotransferência foi realizado comparando a utilização da sequência genômica do hGH (gDNA) com a complementar (cDNA), em

plasmídeos sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV). Foi observado que o cDNA do hGH foi expresso de maneira mais eficiente na circulação de camundongos *lit/scid*, por um período de 21 dias.

Foram também construídos vetores lentivirais com os genes do hGH (cDNA e gDNA) e do mGH (cDNA), que serão utilizados num próximo estudo, tanto para a transdução de queratinócitos, como para a eletrotransferência *in vivo*. Vetores lentivirais serão de fato necessários para futuros estudos devido a sua reduzida toxicidade em comparação com os retrovirais.

Os resultados deste trabalho, assim como as perspectivas de estudo abertas, têm como meta estabelecer condições para que a terapia gênica seja num futuro próximo uma alternativa viável e segura para o tratamento da deficiência de GH e de outras doenças sistêmicas.

DEVELOPMENT OF ANIMAL MODELS OF GROWTH HORMONE GENE THERAPY USING TRANSDUCED KERATINOCYTES AND DIRECT INJECTION OF NAKED DNA

Nélio Alessandro de Jesus Oliveira

ABSTRACT

Keratinocytes are very attractive cells for *ex vivo* gene transfer and systemic delivery, since proteins secreted by these cells may reach the circulation via a mechanism which mimics the natural process. In this study, retrovirally transduced keratinocytes with the mouse growth hormone (mGH) gene underwent a treatment for adhesion to collagen and clonal analysis, in order to enrich in stem cells the keratinocyte population. The main result was an *in vitro* increase of cell viability for treated keratinocytes, which should result in an increase of the *in vivo* sustainability of hormone secretion, when implanting organotypic cultures onto immunodeficient dwarf (*lit/scid*) mice.

A model for *in vivo* gene therapy based on the electrotransfer of human growth hormone (hGH)-coding naked DNA in the exposed quadriceps muscle of dwarf (*lit/lit*) and immunodeficient dwarf (*lit/scid*) mice was also utilized. Electroporation conditions were optimized, setting up eight 50-V pulses of 20 ms at a 0.5 s interval, using a plasmid containing the ubiquitin C promoter and the genomic hGH sequence. Administration of a single dose of 50 µg of this plasmid led, for the first time in the literature, to sustained levels of circulating hGH of the order of 1.5-3 ng/ml, up to 60 days. The DNA-treated animals presented a highly significant weight gain ($P < 0.001$) of 33.1%, compared to a non-significant weight loss of 4.2% for the control group (saline injected mice + electroporation). The injected quadriceps muscles of the DNA-treated mice showed a 48% weight increase, when compared to the control group ($P < 0.001$). Another electrotransfer study was carried out comparing the use of the genomic hGH sequence (gDNA) with the complementary sequence (cDNA), cloned under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. It was observed that hGH was more efficiently expressed in the circulation of *lit/scid* mice, for 21 days, when injecting cDNA.

Lentiviral vectors containing the hGH (cDNA and gDNA) and the mGH (cDNA) genes were also constructed and will be used in a next study, both for the transduction of keratinocytes or for *in vivo* electrotransfer. Lentiviral vectors will in fact be necessary for future studies, considering their reduced toxicity when compared to retroviral vectors.

The results of this work, as well as opening perspectives of new studies, will establish in the near future conditions for gene therapy as a feasible and safe option for the treatment of GH deficiency and other systemic diseases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Terapia gênica	11
1.2 Terapia gênica cutânea	14
1.3 Injeção direta de DNA plasmidial (naked DNA)	16
1.4 Vetores lentivirais	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos específicos	20
2.2.1 Enriquecimento da população de queratinócitos em células-tronco por meio da separação clonal e da rápida aderência ao colágeno	20
2.2.2 Padronização e emprego da eletrotransferência e otimização do plasmídeo	
2.2.3 Construção de vetores lentivirais contendo os genes do hGH (cDNA e gDNA) e mGH	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Equipamentos e acessórios principais	21
3.1.2 Material utilizado no cultivo celular	22
3.1.3 Material plástico estéril para cultura celular	23
3.1.4 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaios	24
3.1.5 Principais reagentes para biologia molecular	25
3.1.6 Vetores utilizados	26
3.1.7 Linhagens celulares utilizadas	27
3.1.7.1 Fibroblastos GP+E86 e GP+ENV+AM12	27
3.1.7.2 Fibroblastos NIH-3T3-J2	28
3.1.7.3 Queratinócitos humanos primários	28
3.1.7.4 Células HEK-293	28
3.1.8 Animais utilizados	28
3.1.8.1 Camundongos da linhagem C57BL/6J-GHRHR ^{Lit/+} (lit/lit)	29
3.1.8.2 Camundongos da linhagem B6/CB17-Ghrhr ^{lit/+} Prkdc ^{scid} /BM	29
3.2 MÉTODOS	30

3.2.1 Cultura de fibroblastos	30
3.2.2 Cultura de queratinócitos	30
3.2.3 Transdução dos queratinócitos com o vetor de expressão retroviral pLmGHSN e seleção com G418	31
3.2.4 Seleção de células-tronco de queratinócitos por rápida aderência ao colágeno	31
3.2.5 Separação clonal preparativa	32
3.2.6 Preparo da cultura celular organotípica	32
3.2.7 Implante de cultura celular organotípica em camundongos <i>lit/scid</i>	33
3.2.8 Preparação dos plasmídeos pUC-UBI-hGH e pCL-GFP	33
3.2.9 Construção de vetores contendo o DNA genômico (gDNA) e o DNA complementar (cDNA) do hGH	34
3.2.10 Administração <i>in vivo</i> dos vetores contendo os genes do hGH (naked DNA)	35
3.2.11 Bioensaio	36
3.2.12 Radioimunoensaios (RIA) para quantificação de mGH ou de hGH	36
3.2.13 Construção de vetores lentivirais	37
3.2.14 Transfecção de células HEK-293 para produção de vírus	39
4 RESULTADOS	42
4.1 Enriquecimento da população de queratinócitos em células-tronco mediante separação clonal preparativa e aderência rápida ao colágeno	42
4.2 Nível de expressão de mGH <i>in vivo</i> após implante de culturas organotípicas derivadas de queratinócitos enriquecidos	45
4.3 Injeção direta de DNA plasmidial associada à eletrotransferência <i>in vivo</i>	45
4.4 Bioensaio para determinar a atividade do GH proveniente da estratégia de <i>naked DNA</i> associada à eletrotransferência	50
4.5 Construção de vetores contendo o DNA genômico (gDNA) e complementar (cDNA) do hGH	53
4.6 Comparação da eficiência da eletrotransferência entre os plasmídeos contendo o gDNA ou o cDNA do gene do hGH em camundongos <i>lit/scid</i>	55
4.7 Construção de vetores lentivirais	56

4.8 Determinação do título viral dos vetores lentivirais	61
5 DISCUSSÃO	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapia gênica

A terapia gênica pode ser definida como um método para tratar ou prevenir doenças, substituindo a função de genes defeituosos ou ausentes por outros funcionais, ou pela mudança do perfil de expressão de um gene de interesse (revisão em Van Gaal e col., 2006). No passado, a terapia gênica foi considerada apropriada somente para o tratamento de doenças monogênicas, que consistia no princípio de substituir um gene defeituoso por um homólogo funcional. Entretanto, com o aumento da compreensão dos princípios genéticos e ambientais sobre o funcionamento das vias moleculares e dos mecanismos de patogênese, novos alvos potenciais para a terapia gênica, como ferramenta de intervenção de um processo patológico, têm sido identificados recentemente (revisão em Leung e col., 2010).

Desde os primeiros protocolos no final dos anos 80, mais de 1579 testes clínicos foram desenvolvidos em 28 países diferentes, com sucesso significativo em diferentes campos terapêuticos (revisão em Peroni e col., 2005; Edelstein e col., 2007; <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Atualmente, a maior parte dos testes clínicos é para o tratamento do câncer (64,5%); 8,7% são direcionados para as doenças cardiovasculares e 7,9% para as doenças monogênicas (Tabela 1).

Tabela 1: Principais tipos de testes clínicos realizados no âmbito da terapia gênica.

Testes clínicos em andamento	Número	Porcentagem
Câncer	1019	64,5
Doenças cardiovasculares	138	8,7
Doenças monogênicas	125	7,9
Doenças infecciosas	127	8,0
Doenças neurológicas	30	1,9
Doenças oculares	18	1,1
Outras doenças	35	2,2
Marcadores gênicos	50	3,3
Voluntários saudáveis	37	2,3
Total	1579	100

Fonte - The Journal of Gene Medicine, 2009

O primeiro teste clínico realizado no campo da terapia gênica foi conduzido no começo dos anos 70. Três pacientes que possuíam hiperargininemia foram inoculados, por meio da via intravenosa, com o *Shope Papilomavirus*, que codifica a enzima arginase para corrigir a doença. No entanto, os autores não observaram a redução do nível de arginina no sangue destes pacientes, sendo que a possível causa para isso foi atribuída à instabilidade do vetor viral (Friedmann & Roblin, 1972; Escors & Breckpot, 2010).

Nos anos 80, a transferência de genes para células de mamíferos tornou-se uma rotina nos procedimentos *in vitro*. Foi observado que a transferência gênica baseada em retrovírus possuía muitas vantagens, principalmente pelo fato da integração ser estável no genoma das células hospedeiras. Porém, a aplicabilidade posterior desta metodologia na terapia gênica foi controversa, devido ao pobre conhecimento que se tinha na época no campo de regulação gênica e dos possíveis efeitos que um DNA exógeno poderia ter no metabolismo da célula hospedeira, bem como outras implicações do ponto de vista ético (revisão em Escors & Breckpot, 2010).

Nos anos 90, foi realizado um teste clínico para corrigir a deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA), cujo efeito fenotípico está relacionado a uma grave deficiência imunológica que causa a imunodeficiência severa combinada (scid) (Blaese e col., 1995). Em 2000, Calvazzana-Calvo e col. desenvolveram uma terapia para o tratamento da imunodeficiência severa combinada associada a mutações no gene *IL2RG*, uma doença que acomete apenas o sexo masculino, e o teste foi realizado em 11 crianças. Em oposição ao sucesso obtido na correção desta patologia, anos mais tarde o mesmo grupo descreveu o surgimento de leucemia em duas das crianças que foram submetidas ao tratamento (Hacein-Bey-Abina e col., 2003a, 2003b). Isto se deveu ao fato do vetor retroviral ter se integrado próximo ao promotor do oncogene *LMO2*.

Este incidente fez com que pesquisadores e agências reguladoras fossem mais rigorosos quanto à realização de novos testes clínicos. Uma das medidas tomadas por pesquisadores foi tentar aumentar a compreensão dos mecanismos relacionados aos locais de inserção de vetores virais, com a finalidade de descobrir possíveis *hotspots* de inserções dos mesmos. A morte de um paciente causada por uma forte inflamação decorrente da administração de um vetor adenoviral, contribuiu ainda mais para a redução do número de testes clínicos neste campo terapêutico. Este fato também contribuiu para a melhora do *design* de futuros testes clínicos, onde o potencial efeito colateral do vetor e ou das células utilizadas foram considerados com mais cautela, ante ao efeito positivo

que o tratamento em vias de desenvolvimento poderia trazer ao paciente (Aguilar & Aguilar-Cordova, 2003; Raper e col., 2003; Spink & Geddes, 2004; Porteus e col., 2006).

Recentemente, alguns sucessos foram obtidos em testes clínicos ligados à epidermólise bolhosa, à síndrome de neuropatia óptica hereditária de Leber, à beta-talassemia e às mais diversas patologias (Mavilio e col., 2006; Di Nunzio e col., 2008; Baumgartner e col., 2009; Dummer e col., 2010; Simonelli e col., 2010; Roselli e col., 2010).

Duas abordagens principais são utilizadas: a terapia *in vivo* e *ex vivo*. Na terapia *in vivo*, os genes que irão substituir a função dos seus homólogos defeituosos, são transferidos diretamente para os tecidos do animal utilizado no estudo. Na terapia *ex vivo*, células são removidas do animal e cultivadas em laboratório. Nessa população celular é realizada a transferência do gene de interesse e posteriormente as células são selecionadas, assim aquelas que receberam o gene são reimplantadas no animal (Strachan & Read, 1999).

O método escolhido para transferência gênica depende da natureza do tecido-alvo e do tipo de aplicação *in vitro* ou *in vivo*. Os principais veículos de transferência utilizados em células de mamíferos têm sido vetores virais, vetores não virais (*naked DNA*) ou plasmídeos encapsulados em diferentes matrizes e, recentemente, estão sendo desenvolvidos transposons (Strachan & Read, 1999; Izsvák e col., 2000; Kaminski e col., 2002; Sawamura e col., 2002; Liu e col., 2004; Peroni e col., 2005; Jang & Shea, 2006; Ratanamart & Shaw, 2006).

O vetor ideal a ser utilizado para terapia gênica deve seguir os seguintes princípios: especificidade para a célula alvo; resistência à degradação metabólica e ou a um possível ataque do sistema imune; segurança baseada na nulidade ou em efeitos colaterais mínimos; habilidade para expressar apropriadamente o gene de interesse e consequentemente obtenção do efeito terapêutico desejado (Mehier-Humbert & Guy, 2005).

1.2 Terapia gênica cutânea

A pele é um dos tecidos mais atrativos para a terapia gênica por suas células apresentarem algumas particularidades, como: fácil acesso, boa capacidade de serem manipuladas em laboratório, e em caso de alguma reação adversa ao enxerto utilizado em um tratamento, estas células podem ser removidas com facilidade (De Luca & Pelegrini, 1997, Peroni e col., 2008; Therrien e col., 2010). A pele ainda oferece a vantagem da tecnologia de propagação *in vitro* de queratinócitos humanos já estar bem padronizada (Rheinwald & Green, 1975) e ser empregada no tratamento de queimados que recebem implantes autólogos (De Luca e col., 1989). A este respeito foi recentemente obtida a correção gênica da epidermólise bolhosa (JEB), uma grave doença de pele, mediante transplante de queratinócitos modificados pela introdução do gene da laminina-5 (Mavilio e col., 2006; Di Nunzio e col., 2008).

Na terapia gênica cutânea, as principais células-alvo são os queratinócitos, especialmente por ter sido verificado que estas células podem produzir e secretar os produtos gênicos proporcionando efeitos sistêmicos (De Luca & Pellegrini, 1997; Mavilio e col., 2006; Scheidemann e col., 2009; Therrien e col., 2010).

A terapia gênica cutânea apresenta-se como uma alternativa interessante para o tratamento da deficiência do hormônio de crescimento (GH), cujo custo anual por paciente submetido ao uso da proteína recombinante está em torno de 10 mil dólares. A eliminação do inconveniente das repetidas injeções que fazem parte da terapia tradicional também seria outra vantagem decorrente da terapia gênica, bem como o fato do hormônio produzido *in vivo* possuir um mecanismo fisiológico mais parecido com o que ocorre naturalmente (Peroni e col., 2005; Ehrhardt e col., 2008; Peroni e col., 2008).

Várias estratégias de transferência *ex vivo* e *in vivo* do gene do GH em diferentes modelos animais têm sido utilizadas com resultados bastante promissores (Peroni e col., 2005). Já foram realizados estudos de transferência do gene, tanto humano (hGH) quanto de camundongo (mGH), empregando queratinócitos humanos primários transduzidos *ex vivo* e implantados em camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*) (Bellini e col., 2003; Peroni e col., 2006; Peroni e col., 2008). Neste modelo, utilizou-se um vetor retroviral, um dos veículos de transferência mais empregados nos protocolos de terapia gênica, principalmente por ser bastante eficiente, relativamente fácil de ser construído e com capacidade para acomodar genes terapêuticos de diferentes tamanhos, os quais são integrados ao genoma do hospedeiro (Miller e col., 1993; Robbins e col., 1998).

Uma das principais dificuldades que ainda falta ser superada para que a terapia gênica cutânea do GH seja efetivamente aplicada em seres humanos é a obtenção de níveis persistentes de secreção da proteína transgênica, *in vivo* e sua regulação (Taichman, 1999). De fato não foi ainda descrita, por nenhum autor, uma secreção prolongada de GH *in vivo* por queratinócitos com conseqüente aumento de peso. Este efeito fenotípico, mesmo limitado, foi reportado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o gene do hGH (Bellini e col., 2003) e do mGH (Peroni e col., 2006 e 2008). Nestes trabalhos foram também relatados níveis elevados e estáveis de expressão de GH *in vitro*: 7 μg hGH/ 10^6 células/dia e 11 μg mGH/ 10^6 células/dia.

A utilização de uma cultura celular organotípica, que é mais similar ao sistema natural (Parenteau e col., 1996; Kolodka e col., 1998), proporcionou a manutenção dos altos níveis de expressão *in vitro* do mGH, sem necessidade de aderência à superfície da placa. Quando as culturas organotípicas foram implantadas em camundongos *lit/scid*, houve um incremento considerável dos níveis de mGH na circulação dos animais após 1 h do implante. Entretanto, após 24 h do implante, os níveis não foram mantidos, e se igualaram aos valores basais (~2 ng mGH/ml), presentes em camundongos implantados com queratinócitos não modificados geneticamente (Peroni e col., 2006 e 2008).

A rápida queda dos níveis circulatórios da proteína transgênica produzida por queratinócitos humanos primários pode ser atribuída ao: baixo número de células-tronco transduzidas, apoptose, inativação de componentes do vetor retroviral, transporte ineficiente da proteína produzida para a circulação ou mesmo formação de uma barreira entre epiderme e derme que impediria este transporte e que poderia ser ativada mediante um tipo de resposta imunitária do animal a um dos elementos antigênicos oriundos do vetor, do transgene ou da célula modificada (Gerrard e col., 1993; Jensen e col., 1994; Fenjves e col., 1994; Kolodka e col., 1998; Krueger e col., 1999).

As células-tronco são células indiferenciadas definidas por sua habilidade de se auto-regenerar e diferenciar para produzir células progenitoras maduras, incluindo ambas, progenitoras e células terminais diferenciadas efetoras (Wagers & Weissman, 2004). São classificadas em relação ao seu potencial de desenvolvimento como: totipotentes, as células que originam todos os tipos celulares de origem embrionária e extra-embrionária; pluripotentes, as células capazes de dar origem a todos os tipos de células embrionárias; multipotentes, aquelas capazes de dar origem a vários tipos de linhagens celulares; oligopotentes, aquelas capazes de gerar um tipo restrito de linhagem celular; unipotentes,

aquelas capazes de dar origem a somente um tipo de célula madura (Bickenbach & Grinnell, 2004; Wagers & Weissman, 2004).

Em muitos tecidos adultos há uma contínua substituição de células mortas por células novas, e esta substituição se dá de forma que a especificidade de cada tecido seja mantida (Wagers & Weissman, 2004; Abbas & Mahalingam, 2009). No entanto, certas células de mamíferos mantêm um elevado grau de plasticidade para diferenciarem-se em várias linhagens (Terada e col., 2002). Os tecidos que possuem um *turnover* alto, como a pele, são altamente dependentes de células-tronco.

A população de células adultas, que é renovada continuamente na epiderme humana, é mantida por uma subpopulação de queratinócitos conhecida como células-tronco epidermais (Ferrari e col., 2006). Visto que na literatura, a transdução de células-tronco parece ser um pré-requisito importante para a manutenção da expressão da proteína transgênica *in vivo*, uma das metodologias utilizadas para a determinação da porcentagem de células-tronco em determinada população de queratinócitos é a seleção clonal. Nesta seleção são consideradas a clonogenicidade e o elevado potencial de proliferação *in vitro* destas células (Rochat e col., 1994; Mathor e col., 1996; Kolodka e col., 1998, Majo e col., 2008).

Outro método para enriquecer culturas de queratinócitos em células-tronco é baseado na rápida aderência destas células progenitoras a substratos derivados de diferentes tipos de colágeno. Esta propriedade de aderência parece estar relacionada ao comprometimento de uma parte das células basais da epiderme à via de diferenciação celular. Estas células teriam assim a expressão de integrinas diminuída, tornando-se menos aderentes aos componentes da membrana basal, enquanto as células-tronco se adeririam mais rapidamente a estes substratos (Bickenbach & Chism, 1998; Dunnwald e col., 2001; Tibério e col., 2002; Li e col., 2005 e 2008).

1.3 Injeção direta de DNA plasmidial (*naked DNA*)

A maioria dos trabalhos na área da terapia gênica utiliza vetores virais. Entretanto, estes possuem como principais desvantagens a segurança e o alto custo de produção em larga escala. O uso do sistema de transferência gênica não viral, denominado administração de *naked DNA* ou DNA pelado, no qual o material genético é injetado diretamente em alguns tipos de tecido, é mais seguro clinicamente e viável

economicamente. Entretanto, os níveis da proteína transgênica produzida são em geral bem menores do que os níveis obtidos com sistemas virais (Zhang e col., 2002; Peroni e col., 2005; Ratanamart & Shaw, 2006).

Um dos grandes desafios para viabilizar a utilização dos procedimentos de terapia gênica *in vivo*, baseados em naked DNA, é atingir níveis elevados e prolongados da proteína transgênica (Ratanamart & Shaw, 2006).

Contudo, vários estudos mostram que o *naked DNA* é viável, sendo que para isso é necessário melhorar as condições de administração no animal. São necessários estudos mais detalhados relativos à via de administração e à melhora da eficiência de expressão do plasmídeo a ser utilizado, por exemplo, pela incorporação de uma sequência promotora de um gene de expressão constitutiva ou pela utilização de técnicas que aumentem a eficiência da incorporação do vetor nas células-alvo, como eletroporação, ultrassom, dentre outras (Johnson-Saliba & Jans, 2001; Ratanamart & Shaw, 2006).

A primeira evidência de transferência gênica mediada por eletroporação foi descrita a mais de 20 anos, por Neumann e col. (1982), onde células de linfoma de camundongo foram eletroporadas com o objetivo de padronizar uma metodologia eficiente de entrega de material genético para células eucarióticas. Nos anos 90, iniciou-se a larga utilização desta metodologia, sendo nesta época descritos os primeiros trabalhos de transferência gênica que obtiveram sucessos significativos em tecidos como músculo (Aihara & Miyazaki, 1998, Hoover & Magne, 2000), pele (Vanbever & Preat, 1999), fígado (Heller e col., 1996, Suzuki e col., 1998) e tumores sólidos (Bettan e col., 2000, Jaroszeski e col., 2004).

Resultados bastante satisfatórios utilizando o *naked DNA* associado à eletroporação em músculo, tais como os obtidos com o gene da eritropoietina (Epo) e com o do hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH), foram descritos (Rizzuto e col., 1999; Fattori e col., 2005; Prud'homme e col., 2006; Miyazaki & Miyazaki, 2008; Brown e col., 2009; Khan e col., 2010).

A membrana da célula, que é constituída por fosfolipídios, não é normalmente permeável para moléculas dotadas de cargas como o DNA (Fattori e col., 2002; Zampaglione e col., 2005). A eletrotransferência *in vivo* envolve a aplicação de pulsos elétricos curtos e controlados no tecido-alvo após a administração do plasmídeo, resultando no aumento da permeabilidade do material injetado devido à formação de poros (Somari e col., 2000; Zhang e col., 2002; Golzio e col., 2003; Zampaglione e col.,

2005). Dessa forma, as moléculas de DNA que normalmente não podem penetrar na membrana celular, entram na célula após administração de pulsos elétricos.

A eficiência da transferência gênica por meio de eletroporação é influenciada por uma série de fatores, entre os quais se destacam: condição de eletroporação (número de pulsos, duração dos pulsos, voltagem e intervalo entre os pulsos), tamanho e concentração do vetor administrado, tipo de tecido, idade do modelo animal, solvente utilizado para diluir o DNA, tipo de eletrodo (Gehl, 2003; Golzio e col., 2004; Mehier-Humbert & Guy, 2005; Mir, 2009; Roos e col., 2006, Roos e col., 2009; Heller e col., 2010).

Fibras musculares constituem um alvo atrativo para os procedimentos de terapia gênica *in vivo*, baseada na administração de *naked DNA*, seguida ou não de eletroporação, uma vez que este tecido possui fácil acesso e capacidade de expressar produtos gênicos na circulação (Fattori e col., 2005). O tecido muscular também possui outra vantagem sobre outros tecidos, que é o fato dos vetores poderem ser mantidos nas fibras pós-mitóticas após a administração, sendo então capazes de sustentar por um longo tempo a expressão da proteína exógena terapêutica de interesse, uma vez que estas fibras possuem um *turnover* baixo (Tripaty e col., 1996; MacColl e col., 2000).

1.4 Vetores lentivirais

Vetores lentivirais são derivados de vírus pertencentes à família dos retrovírus (Retroviridae, gênero Lentivírus). Os membros desta família possuem o genoma composto por duas fitas simples de RNA e a enzima transcriptase reversa. Os vírus das imunodeficiências humana (HIV), felina (FIV) e simiana (SIV) são os representantes mais bem conhecidos dos lentivírus, devido aos seus efeitos patológicos (Tenório e col., 2008).

Atualmente estão entre os vetores virais mais utilizados pelas características que possuem de se integrarem em células que estão ou não em divisão e proporcionarem a expressão do transgene por um longo tempo, tornando-os atrativos para estudos envolvendo terapia *ex vivo* e *in vivo* (Lewis & Emerman, 1994; Naldini e col., 1996 a, b; D' Costa e col., 2009; Pauwels e col., 2009).

Sucessos consideráveis têm sido obtidos utilizando-se diferentes vetores lentivirais para o tratamento de diversas doenças, como epidermólise bolhosa, ataxia hereditária, doença de Pompe, beta-talassemia (Di Nunzio e col., 2008; Izuka e col., 2009; Kyosen e col., 2010; Roselli e col., 2010).

Outra característica bastante importante para a utilização destes vetores baseia-se no fato de possuírem uma baixa tendência para se integrarem em lugares potencialmente cancerígenos (Montini e col., 2006; Cattoglio e col., 2007). Em um estudo realizado por Cattoglio e col. Foram observadas 77 integrações de vetores retrovirais em regiões de proto-oncogenes e 64 em genes associados a câncer de um total de 1030 integrações estudadas. Para as integrações dos vetores lentivirais foi observado 49 inserções em proto-oncogenes e 32 inserções em regiões associadas à câncers. Isto se deve ao fato destes vetores não se integrarem nas proximidades de elementos regulatórios ou de regiões que controlam genes relacionados ao crescimento e proliferação celular, tendo assim uma baixa capacidade de induzir tumores *in vivo* (Maruggi e col., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente trabalho foi investigar os fatores que ainda impedem a obtenção de níveis terapêuticos prolongados de GH secretado por queratinócitos geneticamente modificados implantados em camundongos anões imunodeficientes *lit/scid*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Enriquecimento da população de queratinócitos em células-tronco por meio da separação clonal e da rápida aderência ao colágeno.

Os estudos foram inicialmente dirigidos para a utilização de uma população de queratinócitos secretores do hormônio de crescimento de camundongo (mGH), que havia sido transduzida com um vetor retroviral, em trabalhos anteriores do nosso grupo. Estas células foram submetidas à análise clonal ou à rápida aderência a substratos derivados de colágeno, com o intuito de obter um enriquecimento dos mesmos em células-tronco. Clones derivados das células tratadas foram utilizados no preparo de culturas organotípicas para verificar um possível aumento de durabilidade da secreção de GH *in vivo* nos camundongos *lit/scid* implantados.

2.2.2 Padronização e emprego da eletrotransferência e otimização do plasmídeo.

Uma segunda estratégia foi a utilização de injeção direta de DNA plasmidial (*naked DNA*), associada à eletroporação, no músculo quadríceps de camundongos anões (*lit/lit*) e anões imunodeficientes (*lit/scid*), inicialmente com o emprego de um vetor contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH). Foi realizada a padronização desta metodologia em tecido muscular, visando uma etapa futura de estabelecimento da eletrotransferência na pele, na tentativa de estabelecer parâmetros de comparação com o nosso modelo de terapia gênica cutânea *ex vivo* (queratinócitos transduzidos). Em relação a esta metodologia foram também realizadas comparações da

eficiência de expressão *in vivo* do hGH, empregando-se plasmídeos contendo a sequência genômica (gDNA) ou a complementar (cDNA) correspondentes ao gene deste hormônio.

2.2.3 Construção de vetores lentivirais contendo os genes do hGH (cDNA e gDNA) e mGH

Vetores lentivirais contendo os genes do hGH (cDNA e gDNA) e mGH foram construídos com o objetivo final de estabelecer um modelo de terapia gênica eficiente e seguro para a deficiência de GH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258 - FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162 - MARCONI (São Paulo, SP, Brasil);
- Autoclave vertical, modelo 103 - FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T - METTLER (Zurich, Suíça);
- Balança analítica, modelo P100N - METTLER (Zurich, Suíça);
- Balança analítica, modelo M5AS - METTLER (Zurich, Suíça);
- Banho Maria, modelo 146-FANEM (São Paulo, SP, Brasil).
- Câmera de Neubauer - BOECO (Hamburg, Alemanha);
- Centrífuga, modelo LS-3 plus - CELM (São Paulo, SP, Brasil);
- Centrífuga, modelo Avanti J-E- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- Centrífuga, modelo 5415D- EPPENDORF (Hauppauge, NY, EUA);
- Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B - SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- Contador gama tipo "poço", com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para ^{125}I de 80% - PACKARD INSTRUMENT COMPANY (Downers Grove ,IL , EUA);
- Destilador de água, modelo 016 - FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Eletroporador, modelo LKB ECPS 3000/150, PHARMACIA (Pittsburgh, PA, EUA);
- Eletroporador de tecidos biológicos, construído *in house* (São Paulo, SP, Brasil);
- Eletrodos (um par) de platina pura de 5,5 x 2,0 x 3,0 mm não invasivos (Heraeus Vectra do Brasil, São Paulo, SP);
- Espectrofotômetro, modelo Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences (Pittsburgh, PA, EUA);
- Estufa de cultura celular, modelo 3159 - FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);

- 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);
- Medidor digital de pH, modelo 420A - ORION (Boston, MA, EUA);
- Membranas de filtração de 0,22 µm - MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Microscópio invertido, modelo ID 03 - CARL ZEISS (Oberkochen, Alemanha);
- Microscópio confocal, LSM510META-CARL ZEISS (Jena, TH, Alemanha);
- Refrigerador duplex, modelo 320 clear - BRASTEMP (São Paulo, SP, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus - MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Termociclador, modelo DNA Engine- BIO-RAD (Hercules, CA, EUA).
- Tubos de poliestireno para imunoenaios (7,5 x 1,2 cm) - EMTEL (São Paulo, SP, Brasil).
- Ultracentrífuga, modelo Optima L-80 XP- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- Vórtex , modelo *vortex mixer*, FISHER SCIENTIFIC (Pittsburgh, PA, EUA).

3.1.2 Material utilizado no cultivo celular

- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - LABSYNTH (São Paulo, SP, Brasil);
- Ácido etanossulfônico hidroxietilpiperazina (HEPES) - SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Adenina-SIGMA (St. Louis, MO, EUA)
- Bicarbonato de sódio - LABSYNTH (São Paulo, SP, Brasil);
- Colágeno tipo I da cauda de rato – UPSTATE BIOTECHNOLOGY (Lake Placid , NY, EUA);
- Dimetilssulfóxido (DMSO) - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- Dispase - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Fator de crescimento epitelial humano (hEGF) - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Geneticina (G418), Geneticin[®] - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Glicose anidra - CASA AMERICANA (São Paulo, SP, Brasil);

- Hidrocortisona - CALBIOCHEM - NOVABIOCHEM CORPORATION (La Jolla, CA, EUA);
- Insulina de pâncreas bovino - SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Meio Ham - F12 - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Meio DMEM *high glucose* - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Meio DMEM *high glucose* - Cellgro- MEDIATECH (Manassas, VA, EUA);
- *Polyethylenimine* (PEI) - SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA);
- Penicilina-estreptomicina - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Soro de bovino neonato (SBN) - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Soro fetal bovino (SFB) - HYCLONE (Logan, UT, EUA);
- Toxina colérica - SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Transferrina- SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Triiodotironina- SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Tripsina - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA).

3.1.3 Material plástico estéril para cultura celular

- Garrafas de 75 cm² - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Insetos plásticos (membrana Anopore[®] de 0,02μm) - NALGE NUNC INTERNATIONAL (Rochester, NY, EUA);
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 ml - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Placas de 6 poços - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Placas de 24 poços - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Placas de 6 e 10 cm de diâmetro - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Sistemas de filtração de 150, 200, 500 e 1000 ml, porosidade de 0,22μm - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Tubos criogênicos de 2 ml - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA);
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 ml - CORNING COSTAR CORP. (NY, EUA).

3.1.4 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaios

- Anticorpo policlonal anti-rGH (lote # AFP5672099), fornecido pelo Dr. A. F. Parlow – NATIONAL HORMONE AND PITUITARY PROGRAM (NHPP, Torrance, CA, EUA);
- 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 imunoensaios baseados em sangue humano, Lyphochek I Immunoassay 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);
- Na¹²⁵I 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);
- Preparação de mGH pituitário (lote # AFP 10783B) altamente purificada, para iodinação, fornecida pelo Dr. A. F. Parlow – NATIONAL HORMONE AND PITUITARY PROGRAM (NHPP, Torrance, CA, EUA);
- Preparação de referência de mGH pituitário (lote # AFP 10783B), fornecida pelo Dr. A. F. Parlow – NATIONAL HORMONE AND PITUITARY PROGRAM (NHPP, Torrance, CA, EUA);
- Preparação de hGH recombinante altamente purificada para iodinação – IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil) (Ribela e col., 1993; Oliveira e col., 1999);
- Resinas cromatográficas 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);

- Tween-20 - SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

3.1.5 Principais reagentes para biologia molecular

- Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Bactérias termocompetentes *One Shot Top10* – INVITROGEN (Carlsbad,CA,EUA);
- Brometo de etídio – LKB-PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, Ontário, Canadá);
- Enzima de ligação *Rapid Ligase* – Roche (Madison, WI, EUA)
- Enzima de ligação *T4 DNA ligase* – FERMENTAS (Burlington, Ontário,Canadá);
- Enzima fosfatase alcalina (CIAP) – FERMENTAS (Burlington. Ontário, Canadá);
- Enzima *Taq* polymerase *Expand Taq High fidelity PCR System* – Roche (Madison, WI, EUA)
- Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- Filtros Hybond N – GE HEALTHCARE BIOSCIENCES (Piscataway, NJ, EUA);
- Hiperfilme Kodak – GE HEALTHCARE BIOSCIENCES (Piscataway, NJ, EUA);
- Marcador de peso molecular *2-log-DNA Ladder* – NEW ENGLAND (Ipswich, MA, EUA);
- Marcador de peso molecular *lambda DNA / ECORI + HindIII* – FERMENTAS (Burlington, Ontário, Canadá);
- Marcador de peso molecular *100 pb GeneRuler™* - FERMENTAS (Burlington, Ontário, Canadá);
- Sistema para purificação de DNA QIAGEN *Quiaquick Nucleotide Removal Kit* – QIAGEN (Hilden, Alemanha).
- Sistema para extração de DNA mini-prep QIAGEN – QIAGEN (Hilden, Alemanha).
- Sistema para extração de DNA maxi-prep QIAGEN – QIAGEN (Hilden, Alemanha).

3.1.6 Vetores utilizados

- **pLmGHSN (6620 pb)** – plasmídeo construído em nosso laboratório (Peroni e col., 2008), a partir do vetor retroviral pLXSN, no qual foi inserido o cDNA do hormônio de crescimento de camundongo (mGH). Este gene foi obtido do plasmídeo pKLMGH, gentilmente cedido pela Dra. Patrícia L. Chang da Universidade Mc Master (Hamilton, Ontário, Canadá).
- **pCL-GFP (6084pb)**– plasmídeo que contém o gene da *green fluorescent protein* (GFP), o promotor da β -actina de galinha e o *enhancer* do citomegalovírus, e que foi fornecido pelo Dr. Anselmo Sigari Moriscot do Instituto de Biociências (ICB) da Universidade de São Paulo.
- **pUC-UBI-hGH (6352 pb)** – plasmídeo gentilmente fornecido pelo Dr. Thomas G. Jensen (The Kennedy Institute, Glostrup, Dinamarca). Este plasmídeo contém o promotor da ubiquitina C (posição -1464 a -15) e a sequência genômica do hGH (2152 pb).
- **pcDNA3.1 (+) e (-) (5428/5427 pb)** – plasmídeos comerciais da empresa INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA), que contém o promotor viral CMV.
- **p λ P_LhGH (3332 pb)** – plasmídeo que contém a sequência complementar (cDNA) do gene do GH humano (Patente PI 0406443-7, depositada pelo nosso grupo de pesquisa), o promotor λ P_L e o gene para resistência à ampicilina (Soares e col. 2003).
- **pCR^R 2.1-TOPO^R (3900 pb)** – vetor de clonagem da INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA).
- **pLVX-IRES-ZsGreen1(8204 pb)** – plasmídeo gentilmente fornecido pelo Dr. Alysson R. Muotri (Programa de Células-tronco, Universidade da Califórnia, San Diego, CA, EUA). É um vetor lentiviral bicistrônico derivado do vírus HIV-1, que permite a expressão simultânea da proteína de interesse e da proteína repórter GFP (*Green fluorescent protein*) derivada do organismo de coral *Zoanthus SP*. A expressão do transcrito bicistrônico é dirigida de forma constitutiva pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV), localizado *upstream* ao sítio múltiplo de clonagem. Um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) está posicionado entre o sítio múltiplo de clonagem e o gene que codifica para a proteína repórter (ZsGreen1), o que facilita a tradução desta proteína (Fig. 1).

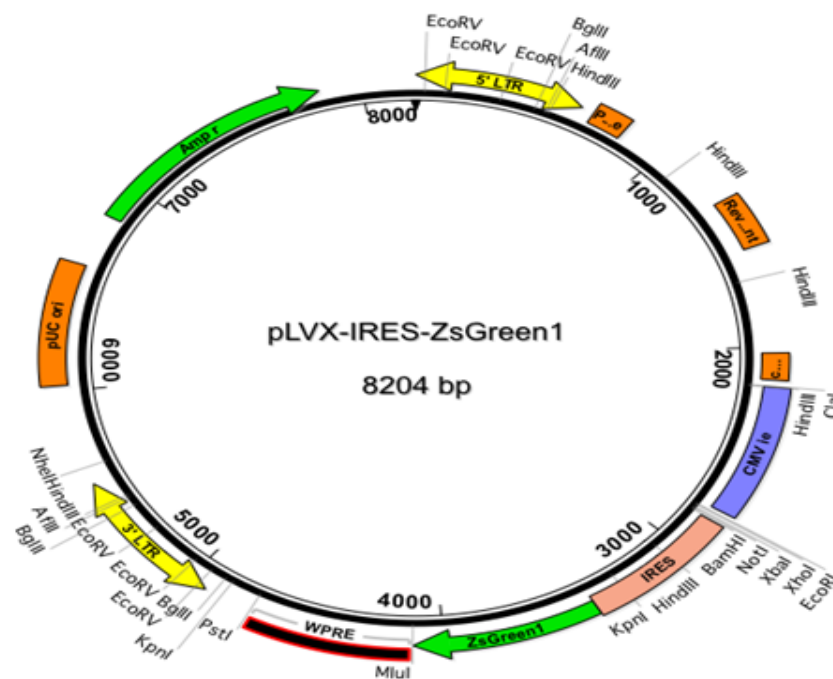


Fig. 1: Mapa do vetor lentiviral bicistrônico pLVX-IRES-ZsGreen1, onde se pode observar o promotor CMV, o IRES, o gene que codifica para a proteína repórter (ZsGreen1) e o sítio múltiplo de clonagem para inserção dos genes de interesse.

3.1.7 Linhagens celulares utilizadas

3.1.7.1 Fibroblastos GP+E86 e GP+ENV+AM12

Foram utilizadas as células da linhagem GP+E86, denominadas ecotróficas por sua capacidade de infectar células murinas, e também células da linhagem GP+ENV+AM12, denominadas anfotróficas, pela capacidade de infectar tanto células murinas, como também células humanas (Markowitz e col., 1988a; 1988b). Estas linhagens celulares, derivadas de fibroblastos de camundongo NIH-3T3 co-transfectados com plasmídeos contendo os genes gag, pol e env, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bank da Columbia University (NY, EUA).

3.1.7.2 Fibroblastos NIH-3T3-J2

Estas células são fibroblastos de camundongo, que foram utilizadas como camada de sustentação (*feeder layer*) para os queratinócitos humanos. A linhagem destas células foi cedida pelo Dr. Carlos Pincelli (Modena, Itália).

3.1.7.3 Queratinócitos humanos primários

São células presentes na camada epidérmica, que foram obtidas a partir de fragmentos de pele humana resultante de cirurgia plástica de mama (mamoplastia) ou a partir de prepúcio de neonatos, de acordo com o protocolo descrito por Green e col. (1979), modificado em nosso laboratório (Rosauero, 2003; Cecchi, 2008).

3.1.7.4 Células HEK 293

São células derivadas de rim embrionário humano modificadas com adenovírus, que possuem como características a facilidade do cultivo por longos períodos, transfecção simples e eficiente com os mais diversos tipos de vetores, bem como a expressão transgênica de diversas proteínas (Graham e col., 1977, Shaw e col., 2002).

3.1.8 Animais utilizados

A linhagem de camundongos anões imunodeficientes CB17-Ghrhr lit/+ Prkdc scid/Bm, mais conhecida como *lit/scid*, e a de C57BL/6J-GHRH (lit/+), designada *lit/lit*, estão sendo mantidas em nosso biotério a partir de casais reprodutores, adquiridos junto ao *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA). A utilização desses camundongos no presente projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN em 27 de outubro de 2006 (Parecer – Projeto Nº 11/CEPA-IPEN/SP). As colônias derivadas desses animais são mantidas 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*

Os animais da linhagem *lit/scid*, por apresentarem uma imunodeficiência severa, são mantidos em microisoladores, dentro de uma área de criação controlada, e todo material utilizado para sua manutenção, bem como a ração e água servidas, é esterilizado para garantir a saúde desses animais.

3.1.8.1 Camundongos da linhagem C57BL/6J-GHRHR^{LIT}/+ (*lit/lit*)

Os animais desta linhagem apresentam uma mutação espontânea de origem recessiva, no cromossomo 6, que origina o nanismo (Deitel e col., 2002). As características principais das alterações fenotípicas podem ser visualizadas a partir da segunda semana após o nascimento, como a redução da massa corpórea e das dimensões ósseas.

3.1.8.2 Camundongos da linhagem B6/CB17-Ghrhr^{lit}/+ Prkdc^{scid}/BM (*lit/scid*)

Os camundongos dessa linhagem, além de apresentarem a mutação “*lit*”, descrita anteriormente, apresentam outra mutação autossômica recessiva originada no gene *Prkdc*, situado no cromossomo 16, que lhes confere uma imunodeficiência severa.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultura de fibroblastos

Foram utilizados fibroblastos de camundongos da linhagem NIH - 3T3 - J2, que atuam como uma camada de sustentação dos queratinócitos (*feeder layer*) durante o cultivo celular, quando submetidos à irradiação gama em bomba de cobalto (Co⁶⁰) a uma dose de 60 Gy, antes de atingirem a confluência. Estas células foram mantidas em meio DMEM, acrescido de 10% de soro de bovino neonato (SBN), penicilina - estreptomicina (100 UI/ml - 100 pg/ml) e tamponado a um pH de 7,2 com HEPES (8 mM). A cultura destas células foi realizada em estufa a 37° C e 5% de CO₂, conforme procedimento padrão de nosso laboratório (Rosauero, 2003; Cecchi, 2008).

Para a cultura celular organotípica, foram utilizados fibroblastos humanos, cultivados da mesma maneira, com exceção do meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.2.2 Cultura de queratinócitos

Os queratinócitos humanos foram obtidos de fragmentos de pele derivados de prepúcio de neonato ou de mamoplastia. A obtenção destas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN em 26 de junho de 2002, durante a execução de outros trabalhos do grupo (Rosauero, 2003; Peroni e col., 2006 e 2008) e os queratinócitos extraídos encontram-se criopreservados em nosso laboratório.

Os queratinócitos humanos foram cultivados no meio apropriado para crescimento destas células (KGM - *Keratinocyte Growth Medium*), composto por 70% de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e 30% de meio Ham F-12. A este meio foram adicionados soro fetal bovino (SFB) a 10 %, tampão HEPES (8 mM), toxina colérica (0,1 nM), penicilina-estreptomicina (100 UI/ml – 100 pg/ml), adenina ($1,8 \times 10^{-4}$ mol/l), triiodotironina (20 pM), transferrina (5 µg/ml), hidrocortisona (0,4 µg/ml), insulina (5 µg/ml) e fator de crescimento epidermal (EGF) (10 ng/ml), mantidos em estufa a 37° C e 5% de CO₂ (Mathor, 1994).

3.2.3 Transdução dos queratinócitos com o vetor de expressão retroviral pLmGHSN e seleção com G418

A transdução dos queratinócitos foi realizada utilizando-se o vetor pLmGHSN que contém o gene do mGH, seguindo protocolo estabelecido (Rosauero, 2003), que se baseia no método contato célula-célula somado à adição de polibreno ao meio. Foram semeados 3×10^5 queratinócitos em uma placa de 10 cm de diâmetro, contendo uma camada de sustentação, constituída de 3×10^6 células anfotróficas produtoras de partículas virais secretoras de mGH e fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados na proporção 2:1. Ao meio de cultura foi adicionada uma solução de polibreno numa concentração de 8 µg/ml, seguido de incubação por 16 h. O meio foi, então, trocado por meio KGM e após sete dias de contato, os queratinócitos foram tripsinizados e semeados novamente sobre uma nova camada de sustentação, constituída somente de fibroblastos NIH-3T3-J2. Quando as

células atingiram a semi-confluência, o meio foi trocado e coletado após 24 h para determinação dos níveis de expressão de mGH.

A seleção foi feita com o uso de geneticina (0,6 mg G418/ ml) devido à existência do gene da neomicina fosfotransferase (neo^r) no vetor pLmGHSN, que confere à célula transduzida resistência a este antibiótico.

3.2.4 Seleção de células-tronco de queratinócitos por rápida aderência ao colágeno

Os queratinócitos, após transdução com o gene do mGH, foram semeados em placas de cultura celular previamente recobertas com colágeno humano tipo IV (Bickenbach & Chism, 1998; Tibério e col., 2002; Stern & Bickenbach, 2007). As placas de cultura de 10 cm de diâmetro foram recobertas com 0,25 μg colágeno/ml, 7×10^5 células foram semeadas nas placas e estas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$. As células que não se aderiram em ~5 e 15 minutos foram removidas e contadas. As células aderidas foram observadas quanto à formação de colônias, levando-se em consideração que as colônias maiores, com cerca de 5 mm, são provavelmente provenientes de células-tronco (Mathor e col., 1996; Bickenbach & Chism, 1998; Kolodka e col., 1998; Tibério e col., 2002, Oliveira e col., 2010).

3.2.5 Separação clonal preparativa

Esta separação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kolodka e cols. (1998) e Peroni e cols. (2006). Os queratinócitos transduzidos foram semeados a baixas densidades (~ 500 células/placa de cultura de 10 cm de diâmetro) e os clones foram isolados com a utilização de cilindros de clonagem. As células derivadas de cada clone foram inicialmente semeadas em uma placa de 24 poços (primeira passagem celular), contendo uma camada de fibroblastos irradiados (*feeder layer*). Após intervalos de 7-10 dias, atingindo-se a confluência, as células de cada clone foram transferidas sucessivamente para placas de 6 e 10 cm de diâmetro, perfazendo um total de 4 passagens. Em cada passagem, o meio de cultura condicionado de cada clone foi coletado para a determinação do nível de expressão de mGH por radioimunoensaio e os queratinócitos foram contados para o cálculo de produtividade em $\mu\text{g}/10^6$ células/dia.

3.2.6 Preparo da cultura celular organotípica

A metodologia de preparo deste tipo de cultura, utilizada por Garlick e cols. (1994) e Kolodka e cols. (1998), foi posteriormente modificada pelo mesmo grupo de pesquisa. A principal alteração consistiu na introdução de uma primeira camada acelular composta basicamente de colágeno obtido da cauda de rato. Esta primeira camada acelular foi colocada sobre um inserto de plástico para diminuir a possibilidade da segunda camada se destacar e sofrer um encolhimento. A primeira matriz (camada acelular) é, portanto, composta de meio de cultura DMEM, soro fetal bovino, NaOH 1M e colágeno, cuja mistura foi pipetada sobre o inserto de plástico de 2,5 cm de diâmetro, previamente colocado num poço de uma placa de cultura de 6 poços. Esta mistura foi a seguir colocada na incubadora de CO₂ a 37° C para polimerizar durante aproximadamente 30 min. A segunda matriz (camada celular) foi preparada com os mesmos reagentes adicionando-se 2 x 10⁵ fibroblastos humanos/inserto e a mistura foi pipetada sobre a primeira camada seguida de polimerização por ~ 1 h nas mesmas condições. Foram adicionados então 2 ml de KGM (meio para crescimento de queratinócitos) sobre as matrizes e 3 ml na placa de cultura. Seguiu-se uma incubação de 7 dias na estufa a 37°C e 5 % CO₂ com uma troca de meio, antes da adição dos queratinócitos transduzidos ou controles (7 x 10⁵ células/inserto) sobre as matrizes. Após 4 dias desta adição, os queratinócitos foram mantidos numa interface ar-líquido com apenas 2 ml de KGM na placa (debaixo do inserto), com trocas de meio a cada 2-3 dias. As culturas organotípicas estavam prontas para serem implantadas nos camundongos após 10-14 dias (Fig. 2).

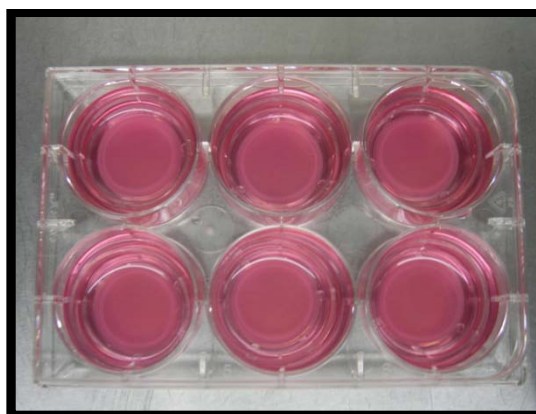


Fig. 2: Culturas organotípicas preparadas com queratinócitos secretores de mGH.

3.2.7 Implante de cultura celular organotípica em camundongos *lit/scid*

Animas com 45-90 dias foram previamente anestesiados com 100 µl de uma mistura, preparada com 2 ml de cloridrato de cetamina (solução injetável a 10 %) e 0,5 ml de cloridrato de xilazina (solução injetável a 2 %) para 2,5 ml de solução salina estéril. A seguir, o pêlo da região escapular dorsal foi retirado e a pele do animal (um círculo de aproximadamente 1,2 cm de diâmetro) foi retirada para acomodar a cultura organotípica, que foi recoberta com um fragmento de gaze parafinada e curativo com *band-aid* durante uma ou duas semanas (Cecchi, 2008; Peroni e col., 2008).

Após 24 h do implante, foram coletadas amostras de sangue via plexo retro-orbital para determinação dos níveis circulatórios de mGH por RIA.

3.2.8 Preparação dos plasmídeos pUC-UBI-hGH e pCL-GFP

Os plasmídeos pUC-UBI-hGH e pCL-GFP foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5 α , usando procedimento padrão e a purificação dos mesmos foi realizada utilizando-se o kit de maxi-prep da Qiagen. Antes de cada administração nos animais do vetor pUC-UBI-hGH, foi realizada análise de restrição com as enzimas EcoRI e BamHI para verificar a presença do inserto (sequência genômica do hGH de 2152 pb).

3.2.9 Construção de vetores contendo o DNA genômico (gDNA) e o DNA complementar (cDNA) do hGH

O DNA genômico (gDNA) e o DNA complementar (cDNA) do hGH foram clonados nos vetores comerciais da Invitrogen pcDNA 3.1(+) e (-) respectivamente, que contém o promotor viral CMV (Fig. 3). O gDNA do hGH (2152 pb) foi obtido do plasmídeo pUC-UBI-hGH, utilizando-se as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, enquanto o hGH cDNA (850 pb) foi obtido do plasmídeo p λ P_LhGH, utilizando-se as enzimas de restrição EcoRI e BamHI. O processo de transformação foi realizado como já descrito acima. Nos procedimentos de purificação, foi utilizado o kit de mini-prep da Qiagen nas etapas relativas à construção, bem como o kit de purificação de DNA em gel de agarose também da Qiagen. Para os experimentos de injeção direta de DNA plasmidial seguida de eletrotransferência, os vetores foram purificados utilizando-se o kit de maxi-prep da Qiagen.

Os vetores purificados foram digeridos com as mesmas enzimas mencionadas acima para a análise da presença dos fragmentos e a análise de orientação foi realizada utilizando a seguinte combinação de enzimas: BamHI e BglIII para o gDNA e EcoRI e BglIII para o cDNA do hGH. Após a digestão, os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% e analisados juntamente com marcadores de peso molecular: Lambda DNA/EcoRI+HindIII, marker 3 e GeneRuler 100pb DNA Ladder. Foram assim obtidos os vetores pcDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA e pcDNA3.1 (-)-hGH-cDNA.

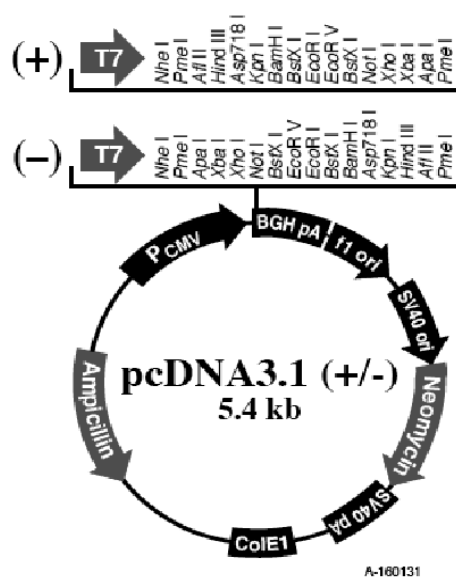


Fig. 3: Plasmídeo comercial pcDNA3.1 (+/-), que possui o promotor derivado do citomegalovírus (CMV), com os sítios de clonagem utilizados para a inserção do gDNA e do cDNA do hGH.

3.2.10 Administração *in vivo* dos vetores contendo os genes do hGH (*naked DNA*)

Vetores plasmidiais contendo os promotores da ubiquitina-C e do citomegalovírus foram utilizados para a transferência gênica direta *in vivo* do hGH, com ou sem o emprego da técnica de eletrotransferência.

Nos experimentos de eletrotransferência utilizou-se um eletroporador construído “in house”. Para a padronização da técnica, os seguintes parâmetros foram utilizados: 8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo, variando-se a voltagem (25, 35, 50 e 75 V). O plasmídeo pCL-GFP, que expressa a proteína repórter GFP, foi utilizado nos ensaios de

padronização da eletrotransferência, sendo a expressão analisada em microscópio confocal.

Diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-hGH, que possui a sequência genômica do hGH, foram testadas: 12,5; 25; 50; 75 e 100 µg.

Os experimentos de eletrotransferência foram realizados no músculo quadríceps de camundongos anões (*lit/lit*) e anões imunodeficientes (*lit/scid*). Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina, seguindo-se uma injeção da enzima hialuronidase na concentração de 20 U/ 50 µl. Após 30 minutos, diferentes quantidades de plasmídeo foram administradas, num volume de 50 µl, seguindo-se a eletrotransferência. Após diferentes tempos, o sangue foi coletado a partir da cavidade retro-orbital e os níveis de hGH foram determinados por meio de radioimunoensaio. Solução salina foi administrada como controle em todos os experimentos.

3.2.11 Bioensaio

Camundongos *lit/scid* (n=16 animais/grupo) e *lit/lit* (n=14 animais/grupo) foram submetidos à injeção de DNA plasmidial e eletroporação, como descrito acima. Um grupo recebeu uma dose única de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH e o outro, solução salina.

O peso dos animais foi determinado diariamente durante todo o experimento e foi utilizado para o cálculo da variação do peso (Bellini & Bartolini, 1993; Bellini e col., 1998 e 2003; Peroni e col., 2008). Níveis circulatórios de hGH foram também determinados após diferentes tempos da eletrotransferência. No final do experimento, os músculos quadríceps injetados e eletroporados (direitos), bem como os músculos intactos (esquerdos) foram retirados dos animais que receberam DNA ou salina e pesados. A significância entre o grupo tratado com DNA e controle (salina) foi determinada pelo teste *t* de *Student*.

3.2.12 Radioimunoensaios (RIA) para quantificação de mGH ou de hGH

Os níveis de expressão *in vitro* ou circulatórios de mGH ou de hGH foram determinados mediante utilização de radioimunoensaios específicos para estes hormônios, padronizados em nosso laboratório (Bellini e col., 2003; Peroni e col., 2008). Os reagentes utilizados são provenientes do NHPP e os ensaios apresentam sensibilidades

de 0,25 ng mGH/ml e de 0,1 ng hGH/ml. Como controle de qualidade, nos ensaios relativos ao mGH foram utilizados soros com concentração média deste hormônio conhecida, obtidos de camundongos *lit/lit* ($1,3 \pm 0,7$ ng mGH/ml; n= 8) e de camundongos normais da linhagem C57Bl6 ($6,5 \pm 1,8$ ng mGH/ml; n=8). No caso do hGH, foram utilizadas preparações comerciais de controle de qualidade (Lyphochek I Immunoassay Plus Control da Biorad-Invitrogen) com diferentes concentrações deste hormônio.

3.2.13 Construção de vetores lentivirais

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o renomado Dr. Alysson Renato Muotri, professor da *University of California San Diego* (UCSD), durante um estágio de fevereiro a junho/2010 (bolsa de doutorado FAPESP 2006/58510-0).

As sequências complementares (cDNA) do hGH e do mGH foram diretamente clonadas no vetor lentiviral bicistrônico pLVX-IRES-ZsGreen1, derivado do HIV-1 e que possui a proteína repórter ZsGreen1 derivada do *Zoanthus sp* (Fig. 1). Estas sequências foram liberadas dos vetores pcDNA 3.1(-)-hGH-cDNA e LmGHSN respectivamente, utilizando-se as enzimas de restrição EcoRI e BamHI, sendo que o cDNA do hGH resultou em um fragmento de 800 pb e o do mGH resultou em um fragmento de 890 pb. Estes fragmentos foram clonados nos mesmos sítios EcoRI e BamHI do vetor lentiviral, utilizando-se o protocolo da *Rapid Ligase* da Roche. Posteriormente, os produtos das reações de ligação foram transformados em bactérias termocompetentes *E. coli One Shot Top10*, usando procedimento padrão e a purificação dos mesmos foi realizada utilizando-se os sistemas comerciais de *mini-prep*, primeiramente para identificar os clones corretos. Para checar a orientação foi utilizada a enzima BglII. Foi também realizada a purificação dos clones corretos por sistemas comerciais de *maxi-prep* para utilização dos vetores nos ensaios de transfecção das células HEK-293.

Para a clonagem da sequência genômica do hGH no vetor lentiviral descrito acima, foi realizada uma reação de PCR para subclonagem no vetor *Topo* (Fig. 4). Esta subclonagem foi necessária para inverter a orientação do nosso inserto, uma vez que este estava clonado no vetor pCDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA entre os sítios BamHI e EcoRI e

para a clonagem no vetor lentiviral escolhido era necessário estar na orientação EcoRI e BamHI. O par de primers utilizados foi:

Forward: 5'- CAAGGCCCAACTCCCCGAACC- 3'

Reverse: 5'- AACTTGCCCCTTGCTCCATACCAC- 3'

Foi utilizada a enzima polimerase *Expand Taq High fidelity PCR System* da Roche para amplificar o produto do PCR e o seguinte protocolo de amplificação:

- 94°C – 2 min

- 94°C – 15 seg
 - 60°C – 30 seg
 - 72°C – 45 seg

} 20 ciclos

- 72 °C – 7 min

- 10°C – ∞

Findado o PCR, a amostra foi aplicada em um gel de agarose 1% para verificar a especificidade do PCR e se o tamanho do inserto (gDNA do hGH) estava correto (1978 pb). O inserto foi clonado no vetor *Topo* seguindo protocolo padrão.

Os vetores purificados foram digeridos com as mesmas enzimas mencionadas acima para a análise da presença dos fragmentos e a análise de orientação foi realizada utilizando-se novamente a enzima BglII. O gDNA hGH foi sequenciado e os *primers* utilizados foram:

Forward: 5'-CCAACAGGGAGGAAACACAACAG-3'

Reverse: 5'-TGGATGAGCAGCAGGGAGATG-3'

Após o sequenciamento, o vetor *Topo* que continha o inserto na orientação certa e sem mutação foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI para liberar o gDNA do hGH, que foi então clonado no vetor lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1.

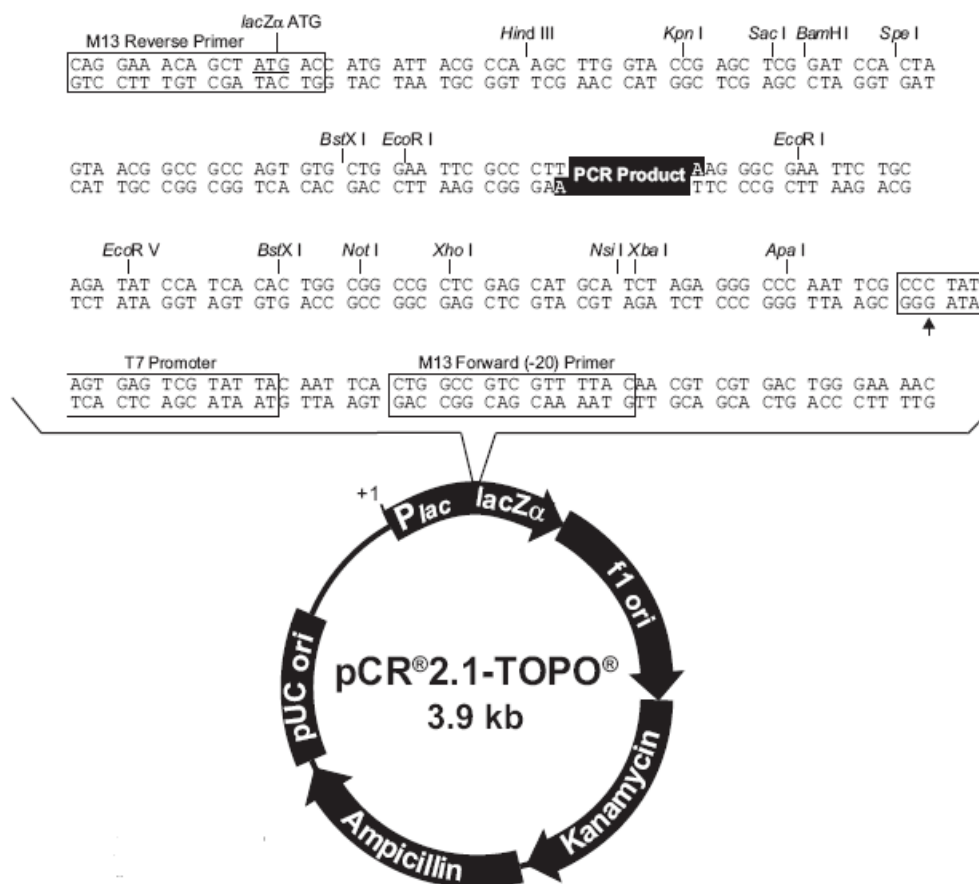


Fig. 4 : Mapa do vetor de clonagem *Topo* com os sítios de clonagem.

3.2.14 Transfecção de células HEK-293 para produção de vírus

Células HEK-293 (células derivadas de rim embrionário humano) foram descongeladas, plaqueadas e cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Após atingirem a confluência (1×10^7 células/ placa de 10 cm de diâmetro), as células foram cultivadas em meio DMEM com 5% de SFB, quando foi realizada a transfecção (experimento realizado em triplicata), seguindo o protocolo descrito por Tiscornia e cols. (2006). Os seguintes plasmídeos também foram utilizados na transfecção:

- pMDL: codifica os genes GAG-POL da proteína precursora que é processada como integrase, transcriptase reversa e proteínas estruturais;
- pREV: codifica uma proteína que interage com o elemento RRE do vetor que aumenta a eficiência de transporte do transcrito;

- pVSVG: codifica o envelope viral que possui a propriedade de conferir ao vírus a habilidade de transduzir uma enorme variedade de células, incluindo células primárias, células-tronco e embrionárias.

Para cada placa de 10 cm de diâmetro foram utilizados:

pLVX-Ires-DsGreen1-hGH ou mGH	12,2 µg (12,2 µl)
pMDL	8,1 µg (8,1 µl)
pREV	3,1 µg (3,1 µl)
pVSVG	4,1 µg (4,1 µl)

Ao volume final de 27,5 µl dos vetores, foram adicionados 500 µl de meio DMEM sem soro e 110 µl de PEI (*polyethylenimine*) (1µg/µl), que possui a função de ajudar no transporte de DNA (Durocher e col., 2007). As amostras foram homogeneizadas e, após 5 minutos, foram distribuídas nas placas de células HEK-293. Após 5 horas, o meio foi trocado por meio DMEM com 5% de SFB.

Dois dias depois, foi verificada a produção de GFP (proteína repórter), por meio de observação direta, utilizando microscópio confocal. O sobrenadante (10 ml) foi recolhido, centrifugado por 2 horas a 4 °C e a 19 000 rpm. Cada amostra (contendo o vírus) foi ressuspendida em 50 µl de meio DMEM *High Glucose* sem soro e armazenada a -80°C.

A determinação do título viral foi também realizada com as células HEK-293. Estas foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem 50% de confluência. Então 5 µl de cada amostra viral foi acrescida a 45 µl de meio DMEM sem soro. Realizou-se uma diluição seriada utilizando-se do mesmo fator de diluição (1:10), sendo que cada amostra referente às diferentes diluições (5 no total) foram semeadas sobre cada poço, num volume de 25 µl. No sexto poço não foi adicionado vírus, sendo que este foi o nosso controle negativo da transdução. A cada 20 min dentro do intervalo de 1 hora, as células foram gentilmente agitadas com o objetivo de distribuir bem o vírus por toda a superfície de cada poço. Completada 1 hora, em cada poço foram adicionados 3 ml de meio DMEM 5% SFB. Como estes vírus são capazes de expressar de forma simultânea a nossa proteína de interesse (mGH ou hGH) juntamente com a proteína repórter GFP, dois dias depois, o título viral foi determinado por meio de observação direta utilizando-se microscópio confocal. Foram escolhidas as diluições que possuíam um número razoável de células

verdes, que fosse possível contar (aproximadamente 40 células). Dez campos para cada diluição escolhida foram contados, e o valor utilizado para fazer o cálculo foi a média destes. O cálculo do título viral em unidades formadoras de colônia (UFC/ml) foi efetuado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Título viral (UFC/ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células GFP positivas} \times \text{área do poço}}{\text{área do campo} \times \text{fator de diluição} \times \text{diluição/ml}}$$

4 RESULTADOS

4.1 Enriquecimento da população de queratinócitos em células-tronco mediante separação clonal preparativa e aderência rápida ao colágeno

A cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH apresentou inicialmente dificuldades técnicas na sua manutenção *in vitro*. Após a 4^a ou 5^a passagem celular, os mesmos se diferenciavam impossibilitando a continuidade da subcultura. Após algumas tentativas sem sucesso de manter estas células em cultivo para realizar a análise clonal e o ensaio da aderência ao colágeno IV, a adição de adenina ($1,8 \times 10^{-4}$ mol/l), de transferrina (5 μ g/ml) e de triiodotironina (20 pM), bem como o aumento da concentração do soro fetal bovino de 4 para 10 % , possibilitou que os mesmos fossem cultivados até a 18^a passagem. A cada passagem foi realizada a coleta do meio de cultura para dosagem do nível de expressão do hormônio pelas células, cujo número foi também determinado para o cálculo da produtividade específica de mGH. Esta subcultura foi realizada com os queratinócitos submetidos ou não ao tratamento de adesão ao colágeno e os níveis de expressão de mGH são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Níveis de expressão de mGH por queratinócitos transduzidos e submetidos à adesão rápida ao colágeno, durante sucessivas passagens celulares em placas de 10 cm de diâmetro.

Passagem celular	Queratinócitos não tratados ($\mu\text{g mGH}/10^6 \text{ cél./dia}$)	Queratinócitos + adesão ao colágeno por 5 min ($\mu\text{g mGH}/10^6 \text{ cél./dia}$)	Queratinócitos + adesão ao colágeno por 15 min. ($\mu\text{g mGH}/10^6 \text{ cél./dia}$)
P4	1,9	2,4	3,7
P5	3,3	2,2	2,4
P6	2,8	3,0	n.d.
P7	2,5	4,7	n.d.
P8	2,1	3,8	n.d.
P9	n.d	2,6	n.d.
P10	4,8	3,4	n.d.
P11	5,0	2,8	n.d.
P12	–	2,4	n.d.

n.d.= não determinado; células não tratadas na 12^a passagem entraram em senescência.

Em termos de aumento da produção de mGH, não foi obtida uma diferença significativa entre as células tratadas com o colágeno e as não tratadas. As tratadas por 5 minutos apresentaram uma produtividade média de $3,1 \pm 0,8 \mu\text{g mGH}/10^6 \text{ cél./dia}$, enquanto que as não tratadas de $3,2 \pm 1,2 \mu\text{g mGH}/10^6 \text{ cél./dia}$. Quanto à viabilidade celular, foi verificado que as células tratadas puderam ser cultivadas por um número maior de passagens do que as não tratadas. As células não tratadas entraram em senescência na 12^a passagem, enquanto as células tratadas por 5 minutos com colágeno chegaram pelo menos até a 18^a passagem. As células tratadas por 15 minutos só foram cultivadas e dosada a produção de mGH até a 5^a passagem, uma vez que apresentaram comportamento semelhante ao das tratadas por 5 minutos.

Os queratinócitos transduzidos oriundos do enriquecimento com colágeno, bem como os sem enriquecer, foram utilizados num experimento de seleção clonal com fins preparativos, ou seja, com a finalidade de utilizar clones de queratinócitos transduzidos mais possivelmente derivados de células-tronco para o preparo de culturas organotípicas. Foram isolados 6 clones de queratinócitos transduzidos submetidos à adesão ao colágeno e 6 clones que não foram tratados. As células derivadas de cada clone foram expandidas durante 4 passagens sucessivas e submetidas à contagem em cada passagem, enquanto os meios condicionados de 24 h foram coletados e o conteúdo de mGH determinado por RIA (Fig. 5). Os resultados indicam que alguns clones oriundos das células provavelmente enriquecidas em células-tronco pela adesão ao colágeno apresentaram maiores níveis de expressão de mGH *in vitro*. Estas células deverão ser submetidas a uma caracterização por marcadores específicos de células-tronco e poderão ser usadas no preparo de culturas organotípicas, com o intuito de aumentar principalmente a durabilidade da expressão de mGH *in vivo*.

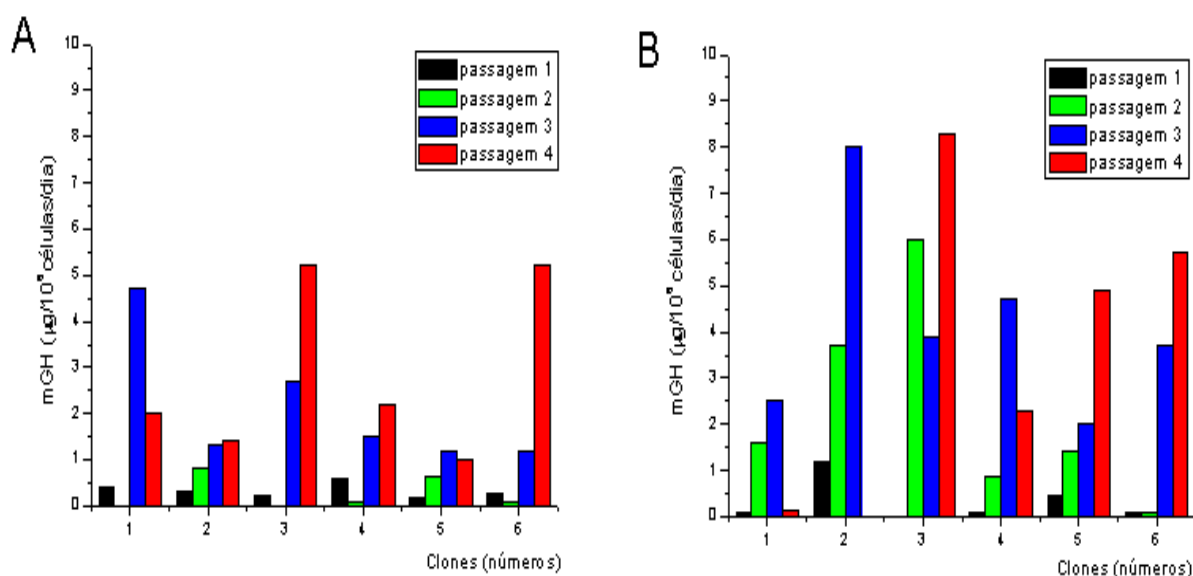


Fig. 5: Níveis de mGH determinados por radioimunoensaio no meio de cultura de células isoladas dos clones de uma população de queratinócitos transduzidos (A) e de clones transduzidos submetidos à adesão rápida ao colágeno (B). As células foram semeadas em placas de 24 poços (passagem 1), foram transferidas para placas de 6 cm de diâmetro (passagem 2) e para placas de 10 cm de diâmetro nas duas últimas passagens (passagens 3 e 4). As placas foram previamente preparadas com uma camada de fibroblastos irradiados (*feeder layer*).

4.2 Nível de expressão de mGH *in vivo* após implante de culturas organotípicas derivadas de queratinócitos enriquecidos

Para realizarmos este estudo, os queratinócitos foram cultivados num modelo de cultura celular organotípica e os epitélios formados foram implantados em camundongos *lit/scid*. As culturas organotípicas derivadas dos queratinócitos transduzidos e enriquecidos pelo método de aderência ao colágeno apresentaram um valor médio de secreção de mGH, após 1 hora do implante, de $14,0 \pm 6,8$ ng/ml (n=3); enquanto os não enriquecidos apresentaram um valor médio de $13,0 \pm 2,0$ ng/ml (n=3). Não houve, portanto, uma diferença significativa de expressão *in vivo* entre as duas populações analisadas.

Será realizado um ensaio para verificarmos se as culturas organotípicas derivadas de queratinócitos enriquecidos pelo ensaio da aderência secretam mGH por um período mais prolongado, uma vez que *in vitro* observamos que as culturas enriquecidas tiveram um aumento em sua viabilidade e talvez esse fato reflita na durabilidade de secreção *in vivo*.

4.3 Injeção direta de DNA plasmidial associada à eletrotransferência *in vivo*

Inicialmente, o plasmídeo pUC-UBI-hGH foi injetado na pele de camundongos *lit/scid*, administrando-se 50 µg via intradérmica, sendo realizada a coleta do sangue para dosagem do hGH na circulação após 1 e 3 dias. No entanto, não foi observada uma diferença significativa na expressão da proteína no grupo dos animais que receberam o plasmídeo, apresentando níveis similares aos dos animais que receberam a solução salina (Fig. 6).

A partir destes resultados, foi decidido usar a técnica da eletrotransferência para tentar aumentar a eficiência da injeção direta de DNA plasmidial (*naked DNA*).

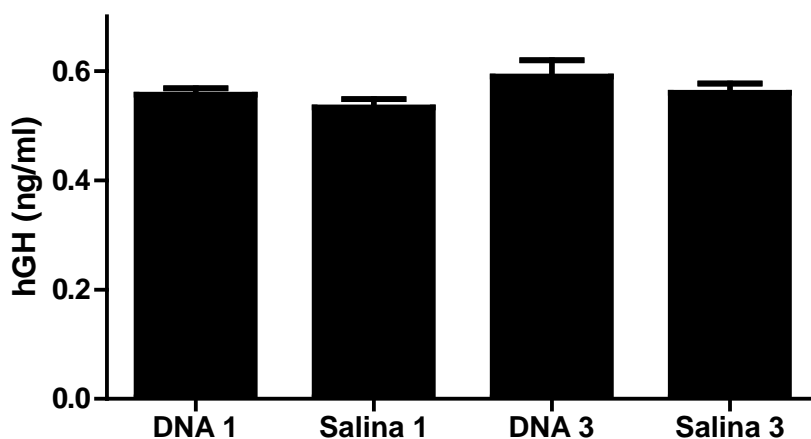


Fig. 6: Níveis de hGH na circulação, determinados por RIA, em soros coletados de camundongos *lit/scid* (n=3 animais/condição), após 1 e 3 dias da administração de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, via intradérmica.

A primeira parte do trabalho de eletrotransferência foi desenvolvida em parceria com o Dr. Anselmo Sigari Moriscot do Laboratório de Plasticidade Muscular (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). Por isso, foi realizada a padronização da técnica utilizando-se o tecido muscular, uma vez que este grupo possuía mais experiência com este tecido e que trabalhos da literatura o citavam como um alvo de sucesso para este tipo de abordagem. Como já citado, o tecido muscular possui uma boa acessibilidade e capacidade de expressar produtos gênicos na circulação (Fattori e col., 2002). Posteriormente, a nossa meta é também realizar a padronização desta técnica na pele para que possamos comparar com o modelo de terapia gênica *ex vivo* (queratinócitos), utilizado em nosso laboratório.

O plasmídeo pCL-GFP, que possui o gene repórter da proteína GFP, foi usado para verificar a viabilidade do emprego da técnica da eletrotransferência muscular e as condições apropriadas para o desenvolvimento da mesma em nosso laboratório. Foram utilizados os seguintes parâmetros em camundongos *lit/lit*: 8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo, onde somente a voltagem foi variada: 25, 35, 50 e 75 V. Como está representado na Fig. 7, o melhor resultado foi obtido com a voltagem de 50 V, onde se pode verificar também que as fibras musculares não apresentaram lesão, pois seus contornos estão nítidos.

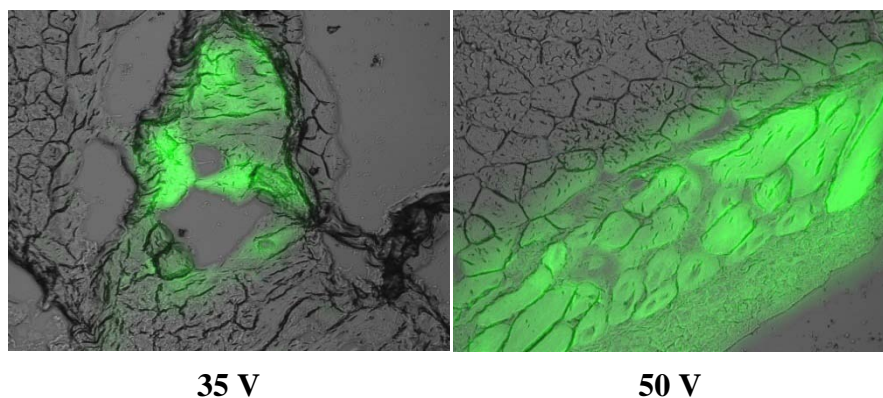


Fig.7: Expressão de GFP após injeção de 50 μg do plasmídeo pCL-GFP, seguida de eletrotransferência, utilizando os seguintes parâmetros: 8 pulsos de 20 ms com intervalo de 0,5 s e diferentes voltagens. Os cortes derivados do músculo quadríceps de camundongos *lit/lit* foram analisados em microscópio confocal.

Padronizada a condição de 8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo e 50 V, diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-hGH foram testadas: 12,5; 25; 50; 75 e 100 μg . O maior nível de expressão de hormônio na circulação em *lit/lit* foi obtido quando 50 μg de DNA foram administrados seguidos de eletroporação e análise após o 3^o dia (Fig. 8). No experimento da Fig. 9 foi testada também a injeção de 50 μg com exposição do músculo quadríceps, já que esta técnica, apesar de ser mais trabalhosa e demorada, propicia o contato direto do eletrodo com o tecido muscular. Esta exposição acarretou num aumento de cerca de 2 vezes do nível circulante de hGH, que foi de 1,7 para 4,0 ng/ml e de aproximadamente 6 vezes em relação ao controle. Nos experimentos seguintes foi sempre utilizada esta exposição do músculo.

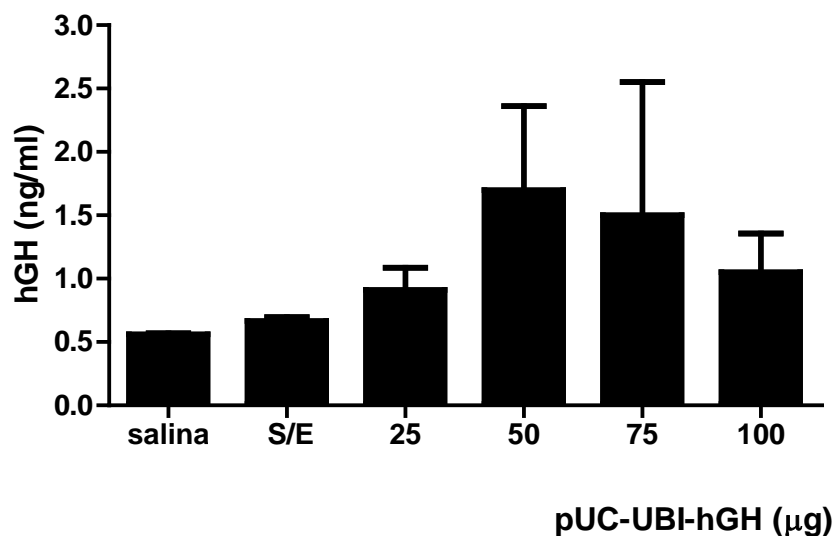


Fig. 8: Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/lit* (n=3 animais/condição), após 3 dias da administração i.m. de diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletrotransferência, utilizando os seguintes parâmetros: 8 pulsos de 20 ms com intervalo de 0,5 s e voltagem de 50 V. S/E é a condição onde 50 µg do plasmídeo foram administrados juntamente com a enzima hialuronidase sem eletroporação.

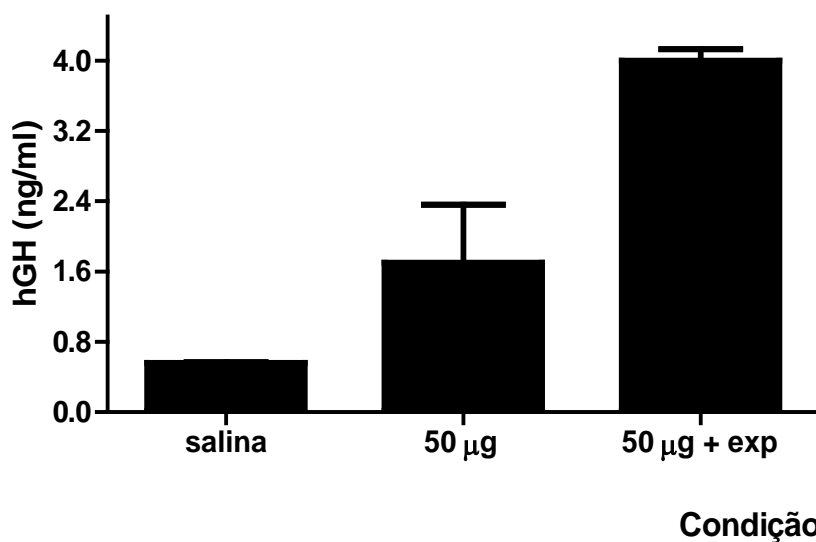


Fig. 9: Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/lit* (n=3 animais/condição), após 3 dias da administração i.m. de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, sem e com exposição (50 µg + exp) do músculo quadríceps, seguida de eletrotransferência, utilizando os seguintes parâmetros: 8 pulsos de 20 ms com intervalo de 0,5 s e voltagem de 50 V.

Foi realizado mais um experimento com diferentes quantidades de plasmídeo e exposição do músculo (Fig. 10), que permitiu a definição de uma curva dose-resposta no intervalo de 0 a 50 μg de DNA, em que $Y_{\text{hGH circulante}} = 0,036X_{\text{DNA injetado}} + 1,11$; $r = 0,806$ $P < 0,01$ ($n=11$).

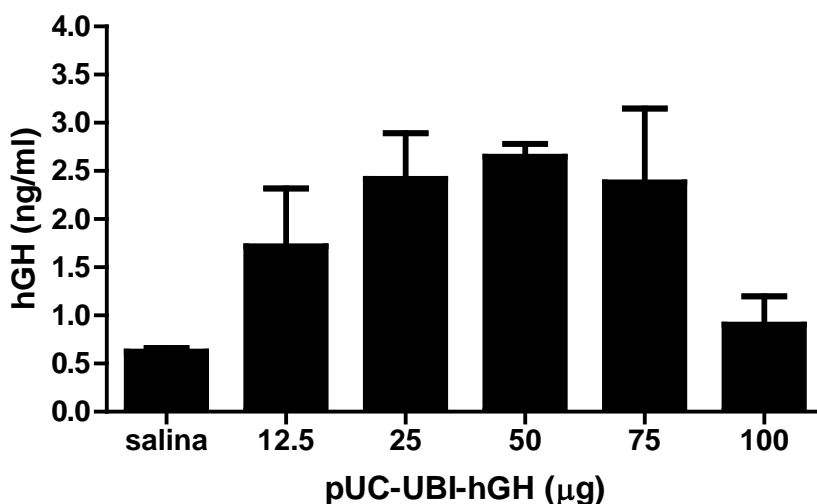


Fig. 10: Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/lit* ($n=3$ animais/condição), após 3 dias da injeção de diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletrotransferência, utilizando os seguintes parâmetros: 8 pulsos de 20 ms com intervalo de 0,5 s e voltagem de 50 V.

Foi assim padronizada a injeção de 50 μg do vetor pUC-UBI-hGH, visto ser uma quantidade útil do ponto de vista econômico e de nível de hGH na circulação obtido. A seguir, foi realizado um ensaio para verificarmos a durabilidade da expressão do hGH *in vivo*, onde amostras de soro foram coletadas até o 12^o dia da injeção do plasmídeo. Níveis circulatórios de 2 a 3 ng de hGH/ml foram mantidos por pelo menos este período em camundongos anões imunocompetentes (Fig. 11).

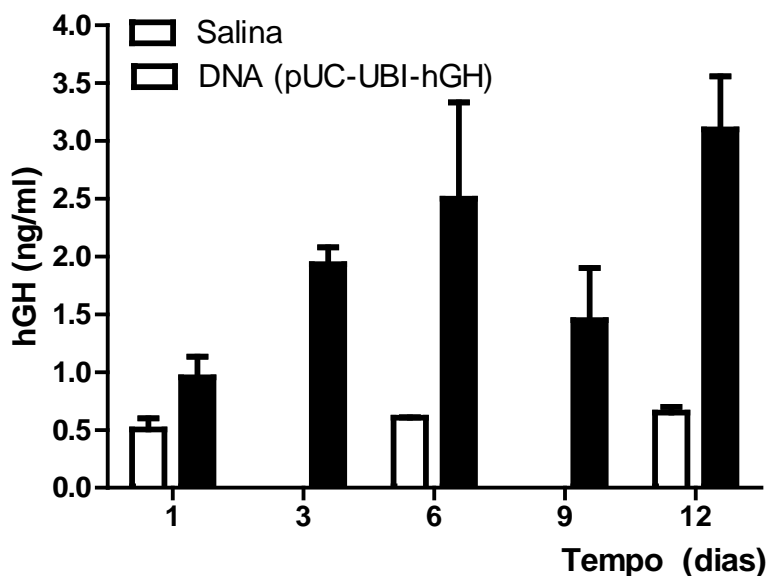


Fig. 11: Níveis de hGH após administração de 50 μ g do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletrotransferência, utilizando 8 pulsos de 50V e 20 ms com 0,5 s de intervalo, em camundongos anões (n=3 animais/tempo).

4.4 Bioensaio para determinar a atividade do GH proveniente da estratégia de *naked DNA* associada à eletrotransferência

Uma vez que foram encontrados níveis circulatórios de hGH por pelo menos 12 dias, após a administração de 50 μ g do plasmídeo PUC-UBI-hGH, foi realizado um ensaio biológico de longa duração para avaliar a ação do hGH em camundongos *lit/scid*. O peso destes animais foi mensurado diariamente por 60 dias, sendo realizada também a coleta de sangue para dosagem do hGH na circulação nos dias 14, 21, 28 e 60 (Fig. 12). Verificou-se um ganho de peso durante os 60 dias com presença contínua de hGH no soro com níveis da ordem de 1,5-3,0 ng/ml, no grupo que recebeu o DNA plasmidial, sendo que no grupo controle houve uma perda de peso não significativa. A curva de crescimento dos animais tratados apresentou uma inclinação de $0,042 \pm 0,018$ g/camundongo/dia, que foi significativamente diferente ($P < 0,001$) da inclinação da curva do grupo controle ($-0,017 \pm 0,018$ g/camundongo/dia). Após 60 dias, o grupo tratado com DNA apresentou um ganho de peso médio de $8,92 \pm 1,29$ para $11,87 \pm 0,53$ g/camundongo, correspondendo a um percentual de 33,1% ($P < 0,001$), enquanto no grupo

controle houve uma diminuição de $9,08 \pm 0,95$ para $8,70 \pm 0,88$ g/camundongo, com um percentual de perda de 4,2% , que não foi estatisticamente significativo.

Considerando os 10 primeiros dias do experimento, a inclinação da curva de crescimento foi de $0,174 \pm 0,021$ g/camundongo/dia, que foi significativamente diferente ($P < 0,001$) da inclinação da curva do grupo controle ($0,051 \pm 0,022$ g/camundongo/dia). Esta inclinação do grupo tratado com DNA plasmidial é similar à inclinação média ($0,195 \pm 0,010$ g/camundongo/dia) da curva de crescimento obtida durante a administração regular de $10 \mu\text{g}$ de hGH recombinante dia por 10 dias em camundongos *lit/lit* (Bellini & Bartolini, 1993, Oliveira e col., 2009, 2010). Vale ressaltar que num experimento similar com este tratamento clássico, os níveis médios de hGH na circulação foram de 1,9 ng/ml (Bellini e col., 2003), ou seja, comparáveis aos obtidos com a estratégia de terapia gênica *in vivo*. Os animais que tiveram DNA injetado no músculo quadríceps apresentaram um aumento de peso deste músculo de 48,1%, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$), enquanto o aumento de peso dos quadríceps não injetados (esquerdos) dos animais que foram tratados com DNA tiveram um aumento de 31,0% ($P < 0,005$), em relação aos mesmos músculos dos camundongos do grupo controle, conforme apresentado na Tabela 3. Os quadríceps que foram injetados com DNA apresentaram um aumento de 45,5%, quando comparados aos quadríceps não injetados do mesmo grupo de camundongos tratados ($P < 0,001$).

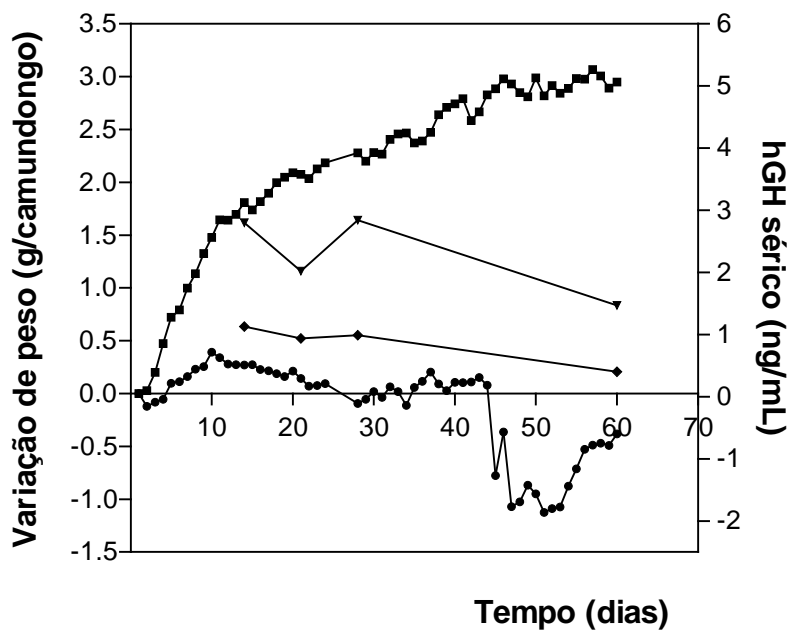


Fig. 12: Variação de peso de camundongos *lit/scid* (n=16 animais/ grupo) tratados somente uma vez com 50 μ g do plasmídeo pUC-UBI-hGH (—■—) ou salina (—●—), seguido de eletrotransferência. Os níveis de hGH no soro também são mostrados para os tratamentos com DNA (—▼—) ou salina (—◆—).

Tabela 3: Peso dos músculos quadríceps dissecados obtidos de camundongos *lit/scid*, submetidos à injeção intramuscular de DNA seguida de eletroporação, após 60 dias.

Grupo animal	de	Quadríceps	Peso após cirurgia (mg)	Aumento de peso DNA x salina (%)	P*
Salina (n=13)	direito		50,05 \pm 9,57	—	—
	esquerdo		38,92 \pm 6,11	—	—
DNA (n=13)	direito		74,14 \pm 13,06	48,1	P<0,001
	esquerdo		50,97 \pm 12,29	31,0	P<0,005

* entre DNA x salina

Um experimento análogo foi realizado utilizando-se camundongos imunocompetentes (*lit/lit*), com 14 animais por grupo. Estes apresentaram aumento de peso menor (21%) que cessou aproximadamente em um mês. A inclinação da curva de crescimento, após 32 dias, foi de $0,048 \pm 0,038$ g/camundongo/dia, sendo estatisticamente diferente ($P < 0,01$) da inclinação da curva do grupo controle. Os níveis circulantes de hGH foram mais elevados, quando comparados com os níveis obtidos nos camundongos *lit/scid*, sendo de 2,0; 4,5 e 6,3 ng/ml nos dias 14, 21 e 32, respectivamente ($P < 0,01$).

4.5 Construção de vetores contendo o DNA genômico (gDNA) e complementar (cDNA) do hGH

Dentre os componentes do vetor que podem ser manipulados para aumentar a eficiência estão o promotor (tecido específico ou constitutivo, promotor não viral) e sequências *enhancers*. É preciso também evitar o uso de sequências que funcionem como *silencers*, bem como escolher a melhor sequência do gene que vai ser utilizada (genômica, complementar, otimizada).

Foi realizada a construção de dois vetores, um contendo o gDNA e outro o cDNA do hGH. A construção que contém o hGH gDNA foi denominada de pCDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA e a que contém o hGH cDNA foi denominada de pCDNA 3.1(-)-hGH-cDNA. O objetivo destas construções foi avaliar se a sequência completa do gene seria importante para a expressão da proteína ou se uma sequência menor seria mais vantajosa, pelo fato de requerer um menor número de etapas para o seu processamento na célula-alvo.

Os produtos das reações de ligação entre os fragmentos do gDNA e do cDNA do hGH e seus respectivos vetores foram transformados em bactérias eletrocompetentes *E. coli* DH5 α . Alguns clones foram amplificados e triados para identificar os que continham o plasmídeo com o respectivo gene de interesse.

Foram analisados 2 clones da construção pCDNA3.1(+)-hGH-gDNA, nos quais 2 continham o fragmento de 2152 pb correspondente ao gene do hGH gDNA (clones 2 e 4); e de um total de 12 clones triados para a construção pCDNA 3.1(-)-hGH-cDNA, dois possuíam o fragmento de 850 pb correspondente ao gene do hGH cDNA (clones 10 e 11) (Fig. 13). A análise de restrição para verificar a orientação do gDNA do hGH foi realizada utilizando-se as enzimas BamH I e Bgl II, e para verificar a orientação do

cDNA do hGH utilizaram-se as enzimas EcoR I e Bgl II. O clone 2 para o gDNA, apresentando uma banda de 1584 pb, e o clone 10 para o cDNA, apresentando bandas de 1375 e de 500 pb, foram considerados corretos para a orientação dos respectivos genes de interesse.

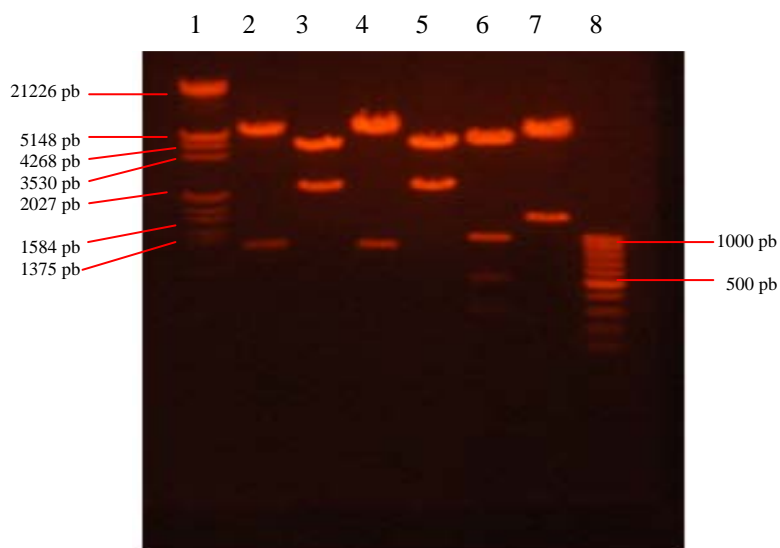


Fig. 13: Análise de restrição do DNA plasmidial derivado de diferentes clones contendo o pCDNA 3.1(+)-hGH-gDNA e o pCDNA3.1(-)-hGH-cDNA1). 1) Marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoR I+Hind III, marker 3; 2) Clone 10 do pCDNA 3.1 (-)-hGH-cDNA (EcoR I/ BamH I); 3) Clone 2 do pCDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA (BamH I/ EcoR I); 4) Clone 11 do pCDNA 3.1 (-)-hGH-cDNA (BamH I/ EcoR I); 5) Clone 4 do pCDNA 3.1 (-)-hGH-gDNA (BamH I/ EcoR I); 6) Clone 10 do pCDNA 3.1 (-)-hGH-cDNA (EcoR I/ Bgl II); 7) Clone 2 do pCDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA (BamH I/ Bgl II); 8) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb.

4.6 Comparação da eficiência da eletrotransferência entre os plasmídeos contendo o gDNA ou o cDNA do gene do hGH em camundongos *lit/scid*

Os plasmídeos pcDNA 3.1 (-)-hGH-cDNA e pcDNA 3.1 (+)-hGH-gDNA, que possuem o promotor do CMV e cuja construção foi relatada no item anterior, foram administrados em camundongos *lit/scid* com a finalidade de comparar a eficiência da expressão do gDNA ou do cDNA do hGH por um período mais prolongado. Os plasmídeos foram administrados no músculo quadríceps de camundongos *lit/scid*, na concentração de 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, seguindo-se a eletrotransferência, de acordo com o protocolo padronizado para o plasmídeo pUC-UBI-hGH. Amostras de soro foram coletadas após 1, 3, 6, 12 e 21 dias, verificando-se um aumento dos níveis de hGH na circulação com ambos vetores até o 6º dia, sendo que após este período somente o vetor contendo o cDNA do gene do hGH manteve a expressão (Fig. 14).

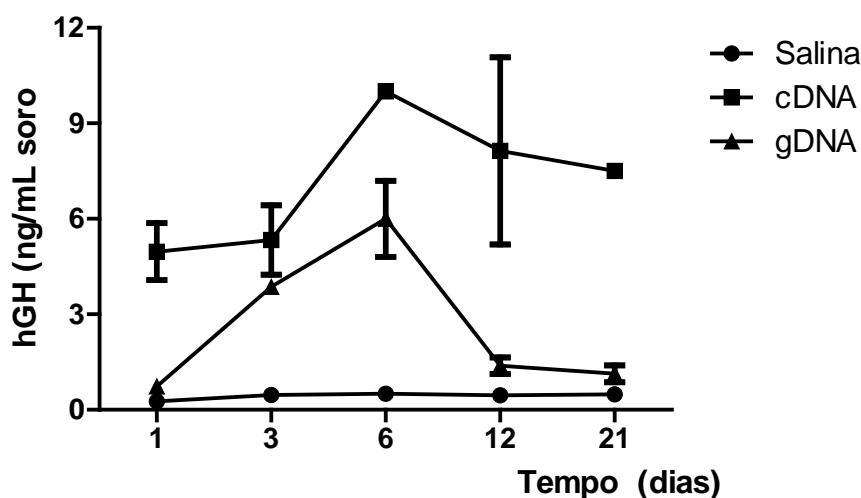
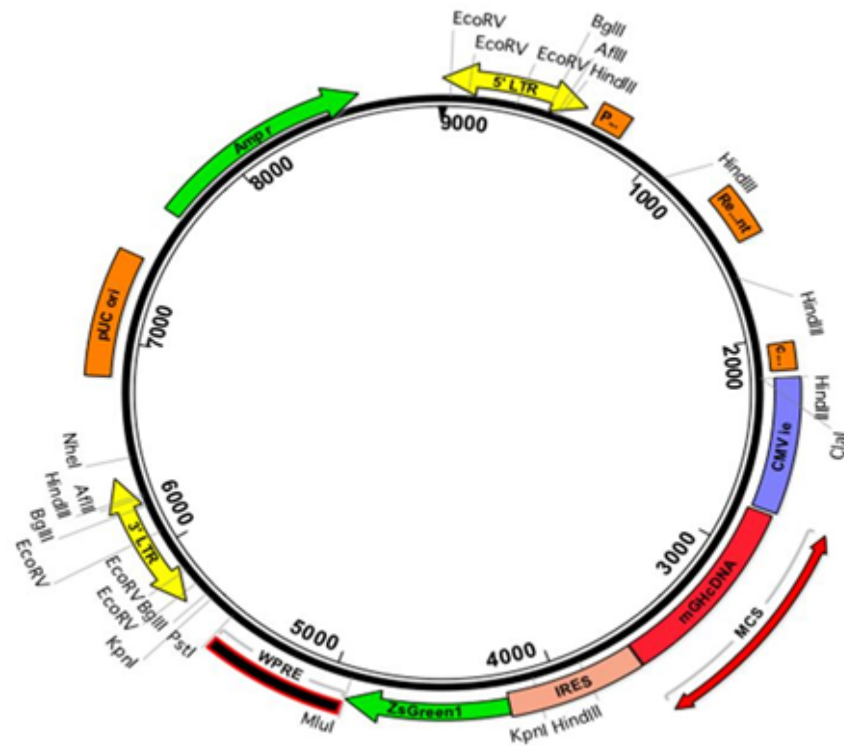


Fig. 14: Níveis circulatórios de hGH após administração de 50 μg dos plasmídeos pCDNA 3.1(-)-hGH-cDNA ou pCDNA 3.1(+)-hGH-gDNA, seguida de eletrotransferência, utilizando-se 8 pulsos de 50 V e de 20 ms com 0,5 s de intervalo, em camundongos *lit/scid* (n=3 animais/tempo).

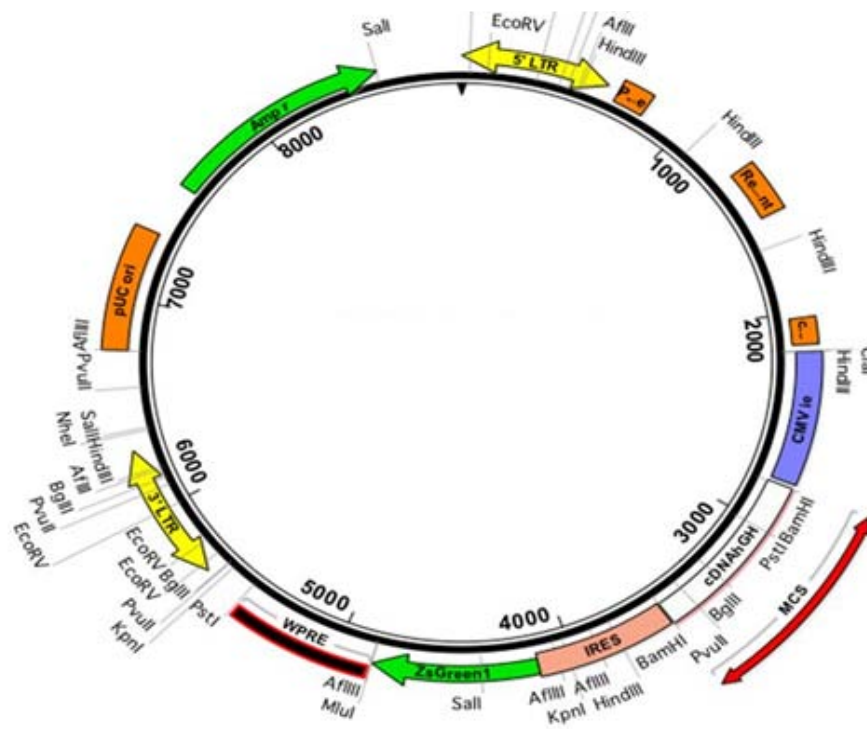
Este resultado indica que o hGH derivado do cDNA é expresso de maneira mais eficiente em células musculares de camundongos do que o gDNA.

4.7 Construção de vetores lentivirais

Após a obtenção dos fragmentos correspondentes aos cDNAs do mGH e do hGH a partir de seus vetores de origem, estes fragmentos foram clonados no vetor lentiviral bicistrônico pLVX-IRES-ZsGreen1, para a construção dos vetores representados na Fig. 15. Nove clones para os cDNA do hGH e do mGH foram triados (utilizando-se as enzimas EcoR I e BamH I), para verificar se estes possuíam o inserto do tamanho certo. Após esta análise, um clone de cada construção que foi considerado correto, foi digerido utilizando-se a enzima Bgl II, para verificar a orientação correta dos insertos. Foi realizada a purificação dos dois vetores obtidos com sistema de *maxi-prep* para posterior transfecção das células HEK-293.



a) pLVX-IRES-Zs-Green1-cDNA-mGH



b) pLVX-IRES-Zs-Green1-cDNA-hGH

Fig. 15: Representação dos vetores lentivirais pLVX-IRES-ZsGreen1-cDNA-mGH (a) e pLVX-IRES-ZsGreen1-cDNA-hGH (b).

Para a construção do vetor pLVX-IRES-ZsGreen1-gDNA-hGH foi necessário realizar um PCR para poder inverter a orientação do inserto, uma vez que este estava clonado na orientação 5' BamHI-EcoRI 3' e o sítio para clonar no pLVX-IRES-ZsGreen1 era 5' EcoRI-BamHI 3'. A temperatura de hibridização escolhida foi de 60 °C.

Realizado o PCR (Fig. 16), o produto foi clonado no vetor *Topo* da Invitrogen para que o inserto fosse invertido. Para verificar se o inserto estava invertido, utilizamos a enzima Bgl II, sendo que a presença das bandas de 2,3 kb e de 3,2 kb indicam que o inserto foi invertido; ao passo que a presença das bandas de 4,2 kb e de 1,3 kb indicam que o mesmo foi clonado sem ser invertido. A análise de restrição de 9 clones demonstrou que 3 estavam na orientação correta, 3 na orientação errada e os outros 3 eram possivelmente falso-positivos (Fig. 17).

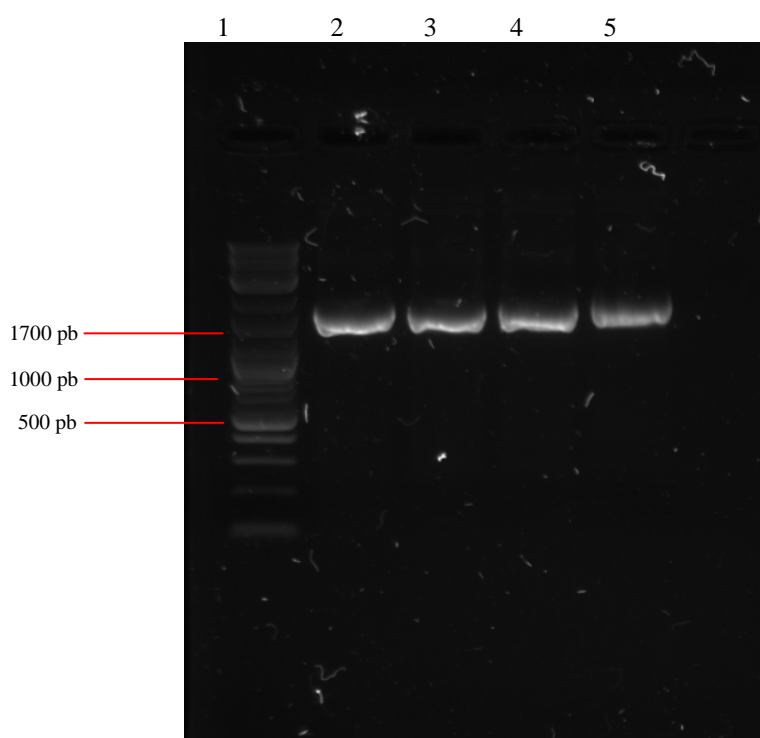


Fig. 16: Produto do PCR correspondente à sequência genômica do hGH. (1) marcador de peso molecular *2-log-DNA Ladder*; produtos amplificados em diferentes temperaturas de hibridização (2) 56 °C, (3) 58 °C, (4) 60 °C, (5) 62 °C.

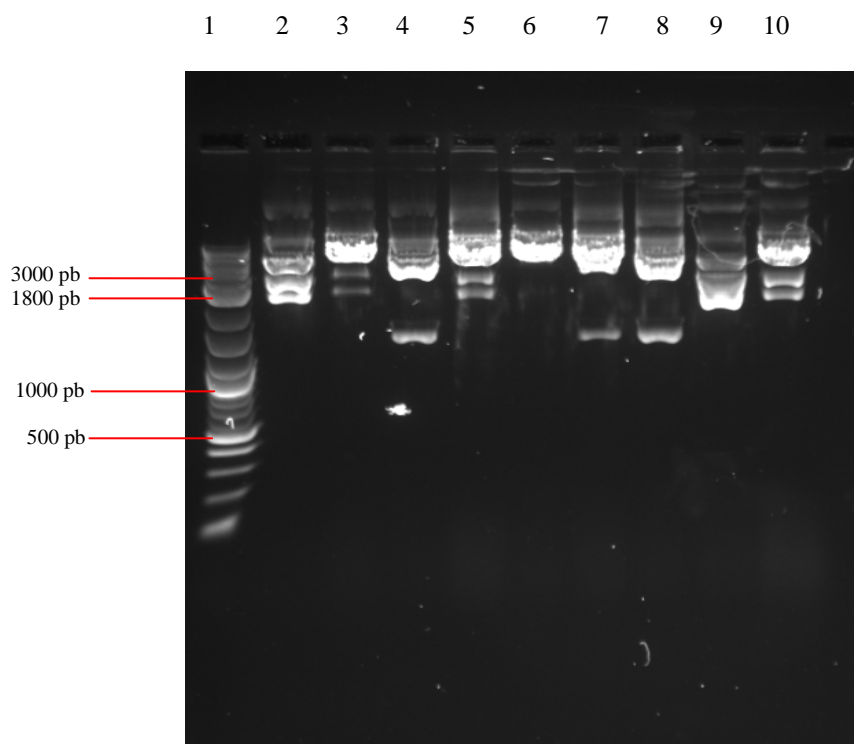


Fig. 17: Análise de restrição de DNA plasmidial de clones derivados do vetor *Topo* contendo a sequência genômica do hGH com a enzima BglIII, para verificar quais insertos foram invertidos durante o procedimento de clonagem nesse vetor. (1) marcador de peso molecular *2-log-DNA Ladder*; (2) clone 1; (3) clone 2; (4) clone 3; (5) clone 4; (6) clone 5; (7) clone 6; (8) clone 7; (9) clone 8; (10) clone 9.

Selecionados os clones considerados corretos (2, 4 e 9), foi realizado o sequenciamento de dois deles (2 e 4) para verificar se ocorreu alguma mutação pontual em decorrência do PCR. O resultado do sequenciamento demonstrou que o clone 2 estava correto. Foi então dado prosseguimento à inserção da sequência genômica do hGH no vetor pLVX-IRES-ZsGreen1, utilizando o procedimento mencionado acima. Sete clones para o gDNA do hGH foram selecionados (utilizando-se as enzimas EcoR I e BamH I) para verificar se estes possuíam o inserto do tamanho certo. Somente o clone 1 foi considerado incorreto, pois não possuía o fragmento de 1800 pb (Fig. 18).

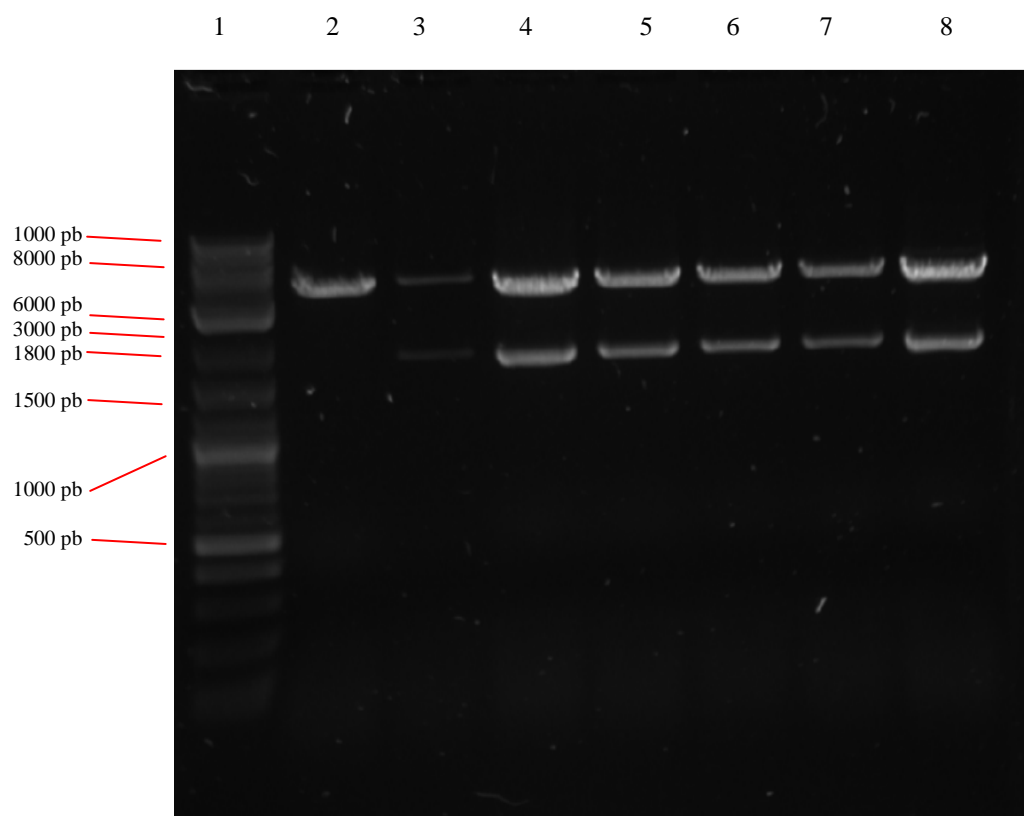


Fig.18: Análise de restrição derivada de diferentes clones da construção do pLVX-IRES-Zs-Green1-gDNA-hGH, utilizando-se as enzimas BamH I/EcoR I. 1) marcador de peso molecular molecular *2-log-DNA Ladder*; 2) clone 1; 3) clone 2; 4) clone 3; 5) clone 4; 6) clone 5; 7) clone 6; 8) clone 7.

Foi realizada a purificação do vetor lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1-gDNA-hGH (Fig. 19), com utilização do sistema de *maxi-prep*, para posterior transfecção das células HEK-293.

concomitante determinação dos níveis de expressão do hGH ou do mGH *in vitro*. Posteriormente, estes queratinócitos transduzidos deverão ser utilizados para a obtenção de culturas organotípicas, que uma vez implantadas em camundongos *lit/scid* serão analisadas quanto aos níveis de secreção *in vivo* desses hormônios e à durabilidade desta secreção. Outra possível utilidade destas construções lentivirais será o seu uso na eletrotransferência *in vivo* (*naked DNA*), visando o estabelecimento de uma metodologia eficiente e segura de terapia gênica em modelo animal.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscou-se estabelecer um modelo animal eficiente de terapia gênica para a deficiência do hormônio de crescimento. Os estudos foram realizados utilizando estratégias de terapia gênica *ex vivo*, por meio de queratinócitos modificados com o gene do mGH, e de terapia gênica *in vivo*, mediante eletrotransferência de diferentes plasmídeos contendo o gene do hGH (*naked DNA*).

A princípio a utilização de queratinócitos como célula-alvo do nosso modelo de terapia gênica *ex vivo* apresentou algumas dificuldades de ordem técnica, tanto na manutenção destas células transduzidas, como no enriquecimento das mesmas pela análise clonal ou pela aderência rápida ao colágeno. Entretanto, o nosso grupo ainda considera que esta estratégia de terapia gênica cutânea não pode ser abandonada sendo que é bastante promissora para utilização em seres humanos, principalmente devido às vantagens, já mencionadas, proporcionadas pelos queratinócitos (Rheinwald & Green, 1975, De Luca e col., 1989, Peroni e col., 2008; Therrien e col., 2010).

Após as alterações realizadas no protocolo de cultivo dos queratinócitos, com a adição de adenina, transferrina e triiodotironina, bem como a mudança da concentração do soro fetal bovino utilizado de 4 para 10 %, a viabilidade das células aumentou, possibilitando a realização de alguns experimentos. Estas alterações estão de acordo com alguns trabalhos da literatura (Mathor, 1994, Mathor e col., 1996, Gragnani e col., 2008).

No ensaio de enriquecimento dos queratinócitos, utilizando-se a estratégia da aderência ao colágeno, não houve diferença entre as células enriquecidas e as não enriquecidas em termos de nível de expressão do mGH *in vitro*; entretanto observamos que as células que foram submetidas ao enriquecimento apresentaram um aumento considerável na sua viabilidade.

Com objetivo de explorar o potencial da aplicação da metodologia do colágeno ao nosso trabalho, foi realizada uma seleção clonal e a preparação de culturas organotípicas para comparar o desempenho dos queratinócitos enriquecidos com aquele dos não enriquecidos. Os clones oriundos de queratinócitos submetidos ao tratamento com o colágeno demonstraram aparentemente um nível maior de produção de mGH, do que os que não foram enriquecidos. A caracterização destes clones utilizando marcadores específicos de células-tronco epiteliais, bem como a utilização destes em culturas organotípicas visando o implante em camundongos para avaliar o potencial *in vivo* destas células enriquecidas, poderá aumentar a durabilidade de secreção do GH *in vivo*.

Ressaltamos a esse respeito que em experimentos anteriores de análise clonal, foi observado que aproximadamente 30% dos clones isolados de uma população de queratinócitos secretores de mGH apresentaram uma manutenção ou aumento da expressão deste hormônio *in vitro* (Peroni e cols., 2006). Esta determinação estava de acordo com a porcentagem encontrada para queratinócitos secretores de β -galactosidase, reportada por Kolodka e col., (1998). Considerando que a transdução destas células progenitoras parece ser um importante pré-requisito para a manutenção da expressão da proteína transgênica *in vivo* (Taichman, 1999, Dunnwald e col., 2001, Bajaj e col., 2005), acreditamos que o investimento de mais esforços para o enriquecimento de uma população de queratinócitos em células-tronco seja vantajoso.

Foi realizado também a preparação e o implante de culturas organotípicas para verificar se há uma diferença em termos de produção de GH, entre os queratinócitos enriquecidos pela estratégia do colágeno comparando com os não enriquecidos. Em termos de níveis circulatórios nos camundongos *lit/scid* não houve diferença para o tempo analisado neste experimento preliminar, mas como foi observado que *in vitro* estas células tiveram uma viabilidade maior, talvez *in vivo* possa acontecer o mesmo. A realização de experimentos para verificar se há um aumento do tempo de expressão *in vivo* de GH pelos queratinócitos enriquecidos pode revelar se esta técnica de fato é viável.

Os resultados obtidos com a metodologia de injeção de DNA plasmidial, seguida de eletrotransferência, foram bastante interessantes, tanto em relação aos níveis de hormônio circulante e à durabilidade da secreção *in vivo*, bem como aos efeitos fenotípicos obtidos quanto ao ganho de peso dos camundongos, após a administração de uma única dose do plasmídeo contendo o gene do hGH. Vale ressaltar que esses resultados foram publicados num importante periódico da área (Oliveira e col., 2010).

Quando diferentes quantidades deste plasmídeo foram administradas no músculo quadríceps de camundongos anões (*lit/lit*), foi obtida uma curva dose-resposta significativa no intervalo de 0-50 μ g de DNA ($P < 0,01$), e o nível máximo de secreção *in vivo* foi obtido com a dose de 50 μ g. Doses maiores apresentaram um efeito de saturação, reportado também por Golzio e col. (2004) e Fattori e col. (2005), como uma possível toxicidade na viabilidade celular devida a plasmídeos contendo os genes do fator de crescimento epidermal (EGF) ou da eritropoietina, respectivamente.

A obtenção de níveis circulatórios de hGH no soro dos camundongos *lit/lit*, 12 dias após a injeção do DNA plasmidial, levou-nos a realizar ensaios de longa duração para verificar o ganho de peso em camundongos *lit/scid* e *lit/lit*. Nestes experimentos, o

ganho de peso total foi de aproximadamente 33% para camundongos *lit/scid*, 60 dias após a administração de uma única injeção de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH, seguida de eletrotransferência. Um aumento menor de peso (aproximadamente 21%) foi obtido quando o mesmo procedimento foi realizado em camundongo *lit/lit*, sendo que o experimento durou 32 dias. Este resultado diferente pode ser interpretado como sendo possivelmente causado pela resposta imune do animal imunocompetente contra a proteína humana ou contra algum elemento do vetor utilizado.

O músculo quadríceps onde foi realizada a eletroporação (direito) dos camundongos *lit/scid* apresentou um aumento de peso da ordem de 48%, enquanto o músculo esquerdo dos mesmos animais apresentou um aumento de aproximadamente 30%. Estes resultados sugerem efeito local (autócrino e ou parácrino) e sistêmico (endócrino) como consequência da expressão e secreção de hGH, resultante da injeção do DNA plasmidial.

Outros estudos já foram realizados com a utilização deste modelo animal. A correção parcial do fenótipo de camundongos anões (*lit/lit*) foi realizada pela incorporação do gene do hormônio de crescimento de rato em células da linhagem germinativa por Hammer e col. (1984) e a correção completa do fenótipo do nanismo foi obtida por Hahn e col. (1996), utilizando um vetor adenoviral com o gene do GH de rato que se expressava de forma constitutiva em hepatócitos.

A administração direta de um plasmídeo com o gene do hGH no músculo esquelético de ratos hipofisectomizados foi realizada por Anwer e col. (1998). Neste estudo foi empregado um sistema de proteção para a entrega do DNA baseado na polivinilpirrolidona. Embora os autores não tenham identificado a presença de hGH no soro dos animais tratados, eles notaram um aumento significativo de IGF-I e aumento de peso 21 dias após a injeção.

Em outro estudo conduzido por Draghia-Akli e col. (1997), foi detectada a presença de mGH no soro da ordem de 36 ng/ml quando comparado ao grupo controle que apresentou na circulação 8,2 ng/ml, após a injeção de 100 µg de um plasmídeo contendo o gene do hormônio liberador de hGH (hGHRH) no músculo quadríceps esquerdo de camundongos adultos normais. Um aumento de peso de aproximadamente 10% foi observado nos animais tratados. Uma quantidade maior deste mesmo vetor (10 mg) levou a um aumento de peso corporal quando administrado em porcos com 3 semanas de idade (Draghia-Akli e col., 1999). Recentemente, este vetor foi utilizado para

a obtenção de níveis fisiológicos de GHRH por um longo período em cães e gatos (Draghia-Akli e col., 2002 a e 2002 b, Draghia-Akli e col., 2006, Brown e col., 2009).

O vetor plasmidial pUC-UBIU-hGH, o mesmo utilizado em nosso trabalho, foi transferido para o fígado de camundongos *NOD/SCID* (37-44 µg de DNA) e camundongos hipofisectomizados (40-50 µg de DNA) usando a estratégia da injeção hidrodinâmica (Dagnaes-Hansen e col., 2002; Sondergaard e col., 2003). Nos camundongos *NOD/SCID*, um aumento de peso de aproximadamente 20% foi observado, com níveis circulantes de GH da ordem de 43,3 ng/ml, 30 dias após a injeção. Nos camundongos hipofisectomizados, foi observado um crescimento longitudinal dos animais, os níveis de hGH circulatórios foram de aproximadamente 50 ng/ml e estes níveis se mantiveram até o fim do estudo (68 dias).

Todos os procedimentos terapêuticos baseados na incorporação em células germinativas, na administração de adenovírus, bem como na transferência hidrodinâmica, apesar de terem proporcionado resultados interessantes, apresentam grandes limitações em sua possível aplicação em seres humanos.

Enfatizamos que em nosso trabalho, pela primeira vez, foram observados níveis circulatórios de hGH, após 60 dias da administração da injeção intramuscular de DNA plasmidial com atividade biológica, confirmando a eficácia e sustentabilidade desta metodologia de terapia gênica *in vivo*. A importância da eletroporação deve ser ressaltada, pois sem a utilização desta técnica, os níveis circulatórios de hGH foram aproximadamente um terço menores (Fig. 8) e, além disso, apresentaram uma grande irreprodutibilidade (resultados não mostrados).

Considerando a curva de crescimento apresentada na Fig. 12, observou-se uma repentina queda da temperatura de aproximadamente 4 °C após o 44^o dia, possivelmente devida a um problema de regulação da estante climatizada onde são mantidos os camundongos *lit/scid*. Esta queda afetou de forma significativa o ganho de peso dos camundongos tratados com salina, mas não apresentou efeito aparente no grupo tratado com DNA. Este fato pode ser atribuído a um efeito de termorregulação conferida a estes animais pelo GH, o que já foi observado em diversos estudos (Juul e col., 1995, Becker e col., 1997, Hana e col., 1992, Gibney e col., 2007).

Ainda não temos uma explicação plausível para os níveis de hGH circulante mais elevados no soro dos camundongos *lit/lit*, comparados aos *lit/scid*. Uma possível razão pode ser devida ao fato da técnica da eletroporação ser mais eficiente nestes animais do que em camundongos *lit/scid*, uma vez que a metodologia foi padronizada

utilizando-se os animais imunocompetentes. Uma outra explicação poderia estar relacionada com a produção de anticorpos específicos para o hGH nos animais imunocompetentes o que impediria que este GH circulante deixasse a circulação para exercer sua função nos tecidos alvos.

Uma observação bastante interessante é a estreita correlação verificada quanto aos níveis circulantes de hGH e ao ganho de peso, após a administração da proteína recombinante ou do DNA (Oliveira e col., 2010), fato também observado recentemente num estudo que comparou a administração de um plasmídeo com o gene do GHRH porcino e a injeção de GH porcino em porcos (Khan e col., 2010). Estes efeitos similares podem ser de grande importância para o planejamento de estudos pré-clínicos e clínicos desta estratégia de terapia gênica *in vivo* utilizando a eletrotransferência, que já tem mostrado resultados promissores recentemente (Melman e col., 2007; Christ e col., 2008; Baumgartner e col., 2009; Wallace e col., 2009).

Foi também verificado que o cDNA, pelo menos no caso do hGH, parece ser mais eficiente nos ensaios de eletrotransferência do que o gDNA. Uma possível causa poderia ser a facilidade do processamento do mRNA, uma vez que talvez este processamento do gDNA em células de camundongo seja menos eficiente, devido à ausência de fatores que poderiam reconhecer possíveis sequências *enhancers* nos introns do hGH genômico, já que células musculares naturalmente não expressam GH. Outra possível explicação seria o tamanho menor, uma vez que este tamanho reduzido do cDNA do hGH em relação ao gDNA, causaria um dano menor às células durante a sua incorporação pelos poros das mesmas, aumentando então o número de células que receberiam o DNA plasmidial (Bloquel e col., 2004; Golzio e col., 2004).

Em paralelo, durante este trabalho foi ainda realizada a construção de vetores lentivirais com os genes do hGH (cDNA e gDNA) e mGH(cDNA). Estes vetores deverão ser utilizados na transdução de queratinócitos, que serão posteriormente implantados nos camundongos *lit/scid*, para verificar se a queda rápida de expressão do transgene *in vivo* se dá por causa da inativação do nosso vetor retroviral ou se é algum problema na produção e ou no transporte de GH pelos queratinócitos. Estas mesmas construções poderão ser também utilizadas na administração direta de DNA plasmidial (*naked DNA*), com o intuito de estabelecer uma metodologia de terapia gênica potencialmente eficiente e segura para o GH.

Foi padronizada com sucesso a técnica de administração intramuscular de *naked DNA* seguida de eletroporação, que poderá ser uma estratégia alternativa de terapia

gênica para a correção da deficiência deste hormônio e de outras doenças sistêmicas. As principais vantagens de uma metodologia de terapia gênica para o GH, como já mencionado anteriormente, são o menor custo, a eliminação das repetidas injeções e a produção do hormônio de forma mais similar ao que acontece naturalmente. Os resultados apresentados com esta metodologia de terapia gênica *in vivo*, quanto aos níveis circulatórios prolongados e ao ganho de peso no modelo animal, associados a estudos futuros sobre possíveis efeitos tóxicos e regulação da expressão, representam etapas importantes para que a mesma possa ser empregada em um teste clínico.

Finalmente, deve-se salientar que este trabalho também abriu novas frentes de estudo, com a possibilidade da futura utilização dos vetores lentivirais secretores de hGH ou de mGH em modelos de terapia gênica *ex vivo* e *in vivo*, na busca contínua de sistemas eficientes e mais seguros para o tratamento desta e de outras doenças sistêmicas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABBAS, O., AND MAHALINGMAM, M. Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. *Br. J. Dermatol.*, v. 161, p. 228-236, 2009.
- 2 AGUILAR, L.K., AND AGUILAR-CORDOVA, E. Evolution of a gene therapy clinical trial. From bench to bedside and back. *J. Neurooncol.*, v. 65, p. 307-315, 2003.
- 3 AIHARA, H., AND MIYAZAKI, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.*, v. 16, p. 867-870, 1998.
- 4 ANWER, K., SHI, M., FRENCH, M.F. MULLER, S.R., CHEN, W., LIU, Q., PROCTOR, B.L., WANG, L., MUMPER, R.J., SINGHAL, A., ROLLAND, A.P. AND ALILA, H.W. Systemic effect of human growth hormone after intramuscular injection of a single dose of a muscle-specific gene medicine. *Hum. Gene Ther.*, v. 20, p. 659-670, 1998.
- 5 BAJAJ, B.G., LEI, P., AND ANDREADIS, S.T. Efficient gene transfer to human epidermal keratinocytes on fibronectin: in vitro evidence for transduction of epidermal stem cells. *Mol. Ther.*, v. 11, p. 969-979, 2005.
- 6 BAUMGARTNER, I., CHRONOS, N., COMEROTA, A., HENRY, T., PASQUET, J.P., FINIELS, F., CARON, A., DEDIEU, J. F., PILSUDSKI, R., AND DELAÉRE, P. Local gene transfer and expression following intramuscular administration of FGF-1 plasmid DNA in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.*, v. 17, p. 914-921, 2009.
- 7 BECKER, B. A., KLIR, J.J., MATTERI, R. L., SPIERS, D.E., ELLERSIEK, M., AND MISFELDT, M.L. Endocrine and thermoregulatory responses to acute thermal exposures in 6-month-old pigs reared in different neonatal environments. *J. Therm. Biol.*, v. 22, p. 87-93, 1997.

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

9 BELLINI, M.H., MATHOR, M.B., DE LUCA, M., CANCEDDA, R., AND 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.

10 BELLINI, M.H., PERONI, C.N., AND 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.

11 BETTAN, M., IVANOV, M.A., MIR, L.M., BOISSIERE, F. DELAERE, P., AND SCHERMAN, D. Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry*, v. 52, p. 83-90, 2000.

12 BICKENBACH, J.R., AND CHISM, E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp. Cell. Res.*, v. 244, p. 184-195, 1998.

13 BICKENBACH, J.R., AND GRINNELL, K.L. Epidermal stem cells: interactions in developmental environments. *Differentiation*, v. 72, p. 371-380, 2004.

14 BLAESE, R.M., CULVER, K.W., MILLER, A.D., CARTER, C.S., FLEISHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTOSHEV, P., GREENBLATT, J.J., ROSENBERG, S.A., KLEIN, H., BERGER, M., MULLEN, C.A., RAMSEY, W.J., MUUL, L., MORGAN, R.A., AND ANDERSON, W.F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, v. 270, p. 475-480, 1995.

15 BLOQUEL, C., FABRE, E., BUREAU, M.F., AND SCHERMAN, D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J. Gene Med.*, v. 6, p. 11-23, 2004.

16 BROWN, P. A., BODLES-BRAKHOP, A.M., POPE, M.A., AND DRAGHIA-AKLI, R. Gene therapy by electroporation for the treatment of chronic renal failure in companion animals. *BMC Biotechnol.*, v.16, p. 4-9, 2009.

17 CATTOGLIO, C., FACCHINI, G., SARTORI, D., ANTONELLI, A., MICCIO, A., CASSANI, B., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., THRASHER, A.J., AIUTI, A., FERRARI, G., RECCHIA, A., AND MAVILIO, F. Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*, v. 110, p. 1770-1778, 2007.

18 CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERATIN, S., CASANOVA, J.L., BOUSSO, P., DEIST, F.L., AND FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, v. 288, p. 669-672, 2000.

19 CECCHI, C.R. **Secreção de hormônio de crescimento de camundongo por queratinócitos humanos primário: perspectivas para um modelo animal de terapia gênica cutânea.** 2008. Tese (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

20 CHRIST, G.J., ANDERSSON, K.E., WILLIAMS, K., ZHAO, W., D'AGOSTINO, R., JR., KAPLAN, J., ABOUSHWAREB, T., YOO, J., CALENDIA, G., DAVIES, K.P., SELLERS, R.S., AND MELMAN, A. Smooth-muscle specific gene transfer with human maxi-k channel improves erectile function and enhances sexual behavior in atherosclerotic cynomolgus monkeys. *Eur. Urol.*, v. 56, p.1055-1066, 2008.

21 DAGNAES-HANSEN, F., HOLST, H.U., SONDERGAARD, M., VORUP-JENSEN, T., FLYVBJERG, A., JENSEN, U.B., and 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. Med.* v. 80, p. 665-670, 2002.

22 D'COSTA, J., MANSFIELD, S.G., AND HUMEAU, L.M. Lentiviral vectors in clinical trials: current status. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, v.11, p.554-564,2009.

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

24 DE LUCA, M., ALBANESE, E., BONDANZA, S., MEGNA, M., UGOZZOLI, L., MOLINA, F., CANCEDDA, R., SANTI, P.L., BORMIOLI, M., STELLA, M. AND MAGLIACANI, G. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns*, v. 15, p. 303-309, 1989.

25 DE LUCA, M. AND PELLEGRINI, G. The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy. *Gene Ther*; v. 4, p. 381-383, 1997.

26 DI NUNZIO, F., MARUGGI, G., FERRARI, S., DI LORIO, E., POLETTI, V., GARCIA, M., DEL RIO, M., DE LUCA, M., LARCHER, F., PELLEGRINI, G., AND MAVILIO, F. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* v. 16, p. 1977-1985, 2008.

27 DRAGHIA-AKLI, R., LI, X.G., AND SCHWARTZ, R.J. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector. *Nature Biotechnol.*, v. 15, p. 1285-1289, 1997.

28 DRAGHIA-AKLI, R., FIOROTTO, M.L., HILL, L.A. MALONE, P.B., DEEVER, D.R., AND SCHWARTZ, R.J. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nature Biotechnol.*, v. 12, p. 1179-1183, 1999.

29 DRAGHIA-AKLI, R., HAHN, K.A., KING, G.K., CUMMINGS, K.K., AND CARPENTER, R.H. Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severely debilitated dogs with cancer. *Mol. Ther.*, v. 6, p. 830-836, 2002a.

30 DRAGHIA-AKLI, R., MALONE, P.B., HILL, L.A., ELLIS, K.M., SCHWARTZ, R.J., AND NORDSTROM, J.L. Enhanced animal growth via ligand-regulated GHRH myogenic-injectable vectors. *FASEB J.*, v. 16, p. 426-428, 2002b.

31 DRAGHIA-AKLI, R., POPE, M.A., BROWN, P.A., AND KHAN, A.S. Plasmid-based expression technology using growth hormone releasing hormone: a novel method for physiologically stimulating long-term growth hormone secretion. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, v. 9, p. 181-185, 2006.

32 DUMMER, R., HAUSCHILD, A., GUGGENHEIM, M., JOST, L., AND PENTHEROUDAKIS, G. ESMO Guidelines Working Group. Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.*, v. 5, p. 194-197, 2010.

33 DUNNWALD, M., TOMANECK-CHALKLEY, A., ALEXANDRUNAS, D., FISHBAUGH, J. AND BICKENBACH, J.R. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp. Dermatol.*, v. 10, p. 45-54, 2001.

34 DUROCHER, Y., PHAM, P.L., SAINT-LAURENT, G., JACOB, D., CASS, B., CHAHAL, P., LAU, C.J., NALBANTOGLU, J., AND KAMEN, A. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *J. Virol. Methods*, v. 144, p. 32-40, 2007.

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

36 EHRHARDT, A., HAASE, R., SCHEPERS, A., DEUTSCH, M.J., LIPPS, H. J., AND BAIKER, A. Episomal vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, v. 8, p. 147-161, 2008.

- 37 ESCORS, D., AND BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v. 58, p. 107-119, 2010.
- 38 FATTORI, E., LA MONICA, N., CILIBERTO, G., AND TONIATTI, C. Electro-gene transfer: a new approach for muscle gene delivery. *Somat. Cell Mol. Genet.*, v. 27, p. 75-83, 2002.
- 39 FATTORI, E., CAPPELLETTI, M., ZAMPAGLIONE, I., MENNUNI, C., CALVARUSO, F., ARCURI, M., RIZZUTO, G., COSTA, P., PERRETTA, G., CILIBERTO, G., AND LA MONICA, N. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J. Gene Med.*, v. 7, p. 228-236, 2005.
- 40 FENJVES, E.S., SMITH, J., ZARADIC, S., AND TAICHMAN, L.B. Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, v. 5, p. 1241-1248, 1994.
- 41 FERRARI, S., PELLEGRINI, G., MATSUI, T., MAVILIO, F., AND DE LUCA, M. Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, v. 6, p. 367-378, 2006.
- 42 FRIEDMANN, T., AND ROBLIN, R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*, v.175, p. 949-955, 1972.
- 43 GARLICK, J.A., AND TAICHMAN, L.B. Effect of TGF- β 1 on re-epithelization of human keratinocytes *in vitro*: an organotypic model. *J. Invest. Dermatol.*, v. 103, p. 554-559, 1994.
- 44 GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand.*, v. 177, p. 437-447, 2003.

- 45 GERRARD, A.J., HUDSON, D.L., BROWNLEE, G.G., AND WATT, F.M. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nature Genet.*, v. 3, p. 180-183, 1993.
- 46 GIBNEY, J., HEALY, M.L., AND SONKSEN, P.H. The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in exercise and sport. *Endocr. Rev.*, v. 28, p. 603-624, 2007.
- 47 GOLZIO, M., ROLS, M.P., AND TEISSIÉ, J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods*, v. 33, p. 126-135, 2004.
- 48 GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., AND NAIM, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, v. 36, p. 59-74, 1977.
- 49 GRAGNANI, A., IPOLITO, M.Z., SOBRAL, C.S., BRUNIALTI, M.K., SALOMÃO, R., AND FERREIRA, L.M. Flow cytometry of human primary epidermal and follicular keratinocytes. *Eplasty*, v. 19, p. 8-14, 2008.
- 50 GREEN, H., KEHINDE, O., AND THOMAS J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 5665-5668, 1979.
- 51 HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J.L., FRASER, C.C., CAVAZZANA-CALVO, M., AND FISHER, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 255-256, 2003a.
- 52 HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., MCCORMACK, M.P., WULFFRAAT, N., LÉBOULCH, P., LIM, A., OSBORNE, C.S., PAWLIUK, R., MORILLON, E., SORENSEN, R., FORSTER, A., FRASER, P., COHEN, J.I., DE SAINT BASILE, G., ALEXANDER, I., WINTERGERST, U., FREBOURG, T., AURIAS, A., STOPPA-LYONNET, D., ROMANA, S., RADFORD-WEISS, I., GROSS, F., VALENSI, F., DELABESSE, E., MACINTYRE, E., SIGAUX, F., SOULIER, J.,

LEIVA, L.E., WISSLER, M., PRINZ, C., RABBITS, T.H., LE DEIST, F., FISHER, A. AND CAVAZZANA-CALVO, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, v. 302, p. 415-419, 2003b.

53 HAHN, T.M., COPELAND, K.C., AND WOO, S.L. Phenotypic correction of dwarfism by constitutive expression of growth hormone. *Endocrinology*, v. 137, p. 4988-4993, 1996.

54 HANA, V., PRASNY, M., MAREK, J., SKRHA, J., AND JUSTOVÁ, V. Reduced microvascular perfusion and reactivity in adult GH deficient patients is restored by GH replacement. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 147, p. 333-337, 2002.

55 HAMMER, R.E., PALMITER, R.D., AND BRINSTER, R.L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature*, v. 311, p. 65-67, 1984.

56 HELLER, R., JAROSZESKI, M., ATKIN, A., MORADPOUR, D., GILBERT, R., WANDS, J., AND NICOLAU, C. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.*, v. 389, p. 225-228, 1996.

57 HELLER, R., CRUZ, Y., HELLER, L.C., GILBERT, R.A., AND JAROSZESKI, M.J. Electrically mediated delivery of plasmid DNA to the skin using a multielectrode array. *Hum. Gene Ther.*, v. 21, p. 357-362, 2010.

58 HOOVER, K.J., AND MAGNE, K.J. A double-injection DNA electro-poration protocol to enhance in vivo gene delivery in skeletal muscle. *Anal. Biochem.*, v. 285, p. 175-178, 2000.

59 IZSVÁK, Z., IVICS, Z., AND PLASTERK, R.H. Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J. Mol. Biol.*, v. 302, p. 93-102, 2000.

60 IZUKA, A., TAKAYAMA, K., TORASHIMA, T., YAMASAKI, M., KOYAMA, C., MITSUMURA, K., WATANABE, M., AND HIRAI, H., Lentiviral vector-mediated rescue of motor behavior in spontaneously occurring hereditary ataxic mice. *Neurobiol. Dis.*, v. 35, p. 457-465, 2009.

61 JANG, J-H., AND SHEA, L.D. Intramuscular delivery of DNA releasing microspheres: Microsphere properties and transgene expression. *J. Control. Release*, v. 112, p. 120-128, 2006.

62 JAROSZESKI, M.J., HELLER, L.C., GILBERT, R., AND HELLER, R. Electrically mediated plasmid DNA delivery to solid tumors in vivo. *Methods Mol. Biol.*, v. 245, p. 237-244, 2004.

63 JENSEN, U.B., JENSEN, T.G., JENSEN, P.K.A., RYGAARD, J., HANSEN, B.S., FOGH, J., KOLVRAA, S. AND BOLUND, L. Gene transfer into culture human epidermis and its transplantation onto immunodeficient mice: an experimental model for somatic gene therapy. *J. Invest. Dermatol.*, v. 103, p. 391-394, 1994.

64 JOHNSON-SALIBA, M., AND JANS, D.A. Gene therapy DNA delivery to the nucleus
Curr. Drug Targets, v. 2. p. 371-399, 2001.

65 JUUL, A., HJORTSKOV, N., JEPSEN, L.T., NIELSEN, B., HALKJAER-KRISTENSEN, J., VAHL, N., JØRGENSEN, J.O., CHRISTIANSEN, J.S., AND SKAKKEBAEK, N.E. Growth hormone deficiency and hyperthermia during exercise: a controlled study of sixteen GH-deficient patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 80, p. 3335-3340, 1995.

66 KAMINSKI, J.M, HUBER, M.R., SUMMERS, J.B., AND WARD, M.B. Design of a nonviral vector for site-selective, efficient integration into the human genome. *FASEB J.*, v.16, p. 1242-1247, 2002.

67 KHAN, A.S., DRAGHIA-AKLI, R., SHYPAILO, R.J., ELLIS, K.L., MERSMANN, H., AND FIOROTTO. M.L. A comparasion 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.

68 KOLODKA T.M., GARLICK J.A., AND TAICHMAN, L.B. Evidence for keratinocyte stem cells *in vitro*: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v 95, p. 4356-4361, 1998.

69 KRUEGER, G.G., JORGENSEN, C.M., MATSUNAMI, N., MORGAN, J.R., LIIMATA, A., MELONI-EHRIG, A., SHEPARD, R., AND PETERSEN, M.J. Persistent transgene expression and normal differentiation of immortalized human keratinocytes *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, v. 112, p. 233-239, 1999.

70 KYOSEN, S.O., IZUKA, S., KOBAYASHI, H., KIMURA, T., FUKUDA, T., SHEN, J., SHIMADA, Y., IDA, H., ETO, Y., AND OHASHI, T. Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long-term expression and glycogen reduction. *Gene Ther.*, v. 17, p. 521-530, 2010.

71 LEUNG, P.S.C., DHIRAPONG, A., WU, P-Y., AND TAO, M.H. Gene therapy in autoimmune diseases: challenges and opportunities. *Autoimmun. Rev.*, v. 9, p. 170-174, 2010.

72 LEWIS, P.F., AND EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, v. 68, p. 510-516, 1994.

73 LI, D.Q., CHEN, Z., SONG, X.J., DE PAIVA, C.S., KIM, H.S., AND PFLUGFELDER, S.C. Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp. Eye Res.*, v. 80, p. 581-590, 2005.

74 LI, J. , MIAO, C., GUO, W. , JIA, L., ZHOU, J. , MA, B., PENG, S., LIU, S., CAO, Y., AND DUAN, E. Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type IV adhesiveness. *Cell Res.*, v. 18, p. 360-371, 2008.

75 LIU, G., ARONOVICH, E.L., CUI, Z., WHITLEY, C.B., AND HACKETT, P.B. Excision of Sleeping Beauty transposons: parameters and applications to gene therapy. *J. Gene Med.*, v. 6, p. 574-583, 2004.

76 MACCOLL, G.S., NOVO, F.J., MARSHALL, N.J., WATERS, M., GOLDSPIK, G., AND BOULOUX, P.M. Optimisation of growth hormone production by muscle cells using plasmid DNA. *J. Endocrinol.*, v. 165, p. 329-336, 2000.

77 MAJO, F., ROCHAT, A., NICOLAS, M., JAOUDÉ, G.A., AND BARRANDON, Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, v. 456, p. 250-254, 2008.

78 MARKOWITZ, D. GOFF, S. AND BANK. A. A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.*, v. 62, p. 1120-1124, 1988a.

79 MARKOWITZ, D. GOFF, S. AND BANK A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *J. Virol.*, v. 167, p. 400-406, 1988b.

80 MARUGGI, G., PORCELLINI, S., FACCHINI, G., PERNA, S.K., CATTOGLIO, C., SARTORI, D., AMBROSIO, A., SCHAMBACH, A., BAUM, C., BONINI, C., BOVOLENTA, C., MAVILIO, F. AND RECCHI, A. Transcriptional enhancers induce insertional gene deregulation independently from the vector type and design. *Mol. Ther.*, v. 17, p. 851-856, 2009.

81 MATHOR, M.B. **Estudos da expressão gênica mediante utilização de queratinócitos humanos normais transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano. “Possível utilização em terapia gênica.”** 1994. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

82 MATHOR, M.B., FERRARI, G., DELLAMBRA, E., CILLI, M., MAVILIO, F., CANCEDDA, R., AND DE LUCA, M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 10371-10376, 1996.

83 MAVILIO F, PELLEGRINI G, FERRARI S, DI NUNZIO, F., DI IORIO, E., RECCHIA, A. MARUGGI, G., FERRARI, G., PROVASI, E., BONINI, C., CAPURRO, S., CONTI, A., MAGNONI, C., GIANETTI, A., AND DE LUCA, M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.*, v. 12, p. 1397-1402, 2006.

84 MELMAN, A., BAR-CHAMA, N., McCULLOGH, A., DAVIES, K., AND CHRIST, G. Plasmid-based gene transfer for treatment of erectile dysfunction and overactive bladder: results of a phase I trial. *Isr. Med. Assoc. J.*, v. 9, p. 143-146, 2007.

85 MEHIER-HUMBERT, S., AND GUY, R.H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 57, p. 733-753, 2005.

86 MILLER, A.D., MILLER, D.G., GARCIA, J.V., AND LYNCH, C.M. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.*, v. 217, p. 581-599, 1993.

87 MIR, L.M. Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future. *Mol. Biotechnol.*, v. 43, p. 167-176, 2009.

88 MIYAZAKI, S., AND MIYAZAKI, J.I. In vivo DNA electrotransfer into muscle. *Develop. Growth Differ.*, v. 50, p. 479-483, 2008.

89 MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., SANVITO, F., PONZONI, M., BARTHOLOMAE, C., SERGI, L., BENEDICENTI, F., AMBROSI, A., DI SERIO, C., DOGLIONI, C., VON KALLE, C., AND NALDINI, L. Hematopoietic stem cell gene

transfer in a tumor prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.*, v. 24, p. 687-698, 2006.

90 NALDINI, L., BLOMER, U., GAGE, F.H., TRONO, D., AND VERMA, I.M. Efficient transfer integration and sustained long-term expression of the transgene in adult brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 11382-11388, 1996a.

91 NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAV, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F.H., VERMA, I.M., AND TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, v. 272, p. 263-267, 1996b.

92 NEUMANN, E., SCAEFER-RIDDER, M., WANG, Y., AND HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electro-poration in high electric fields. *EMBO J.*, v. 7, p. 841-845, 1982.

93 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. AND 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.

94 OLIVEIRA, N.A.J., CECCHI, C.R., HIGUTI, E., BARTOLINI, P., AND PERONI, C.N. Sustained hGH Expression after electrotransfer of naked DNA into dwarf "little" mouse skeletal muscle. *Mol. Ther.*, v. 17, p. S57-S57, 2009.

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

96 OLIVEIRA, N.A.J., CECCHI, C.R., HIGUTI, E. , BARTOLINI, P., AND PERONI, C.N. Enriquecimento de queratinócitos secretors de mGH em células-tronco mediante adesão rápida ao colágeno. *56° Congresso Brasileiro de Genética* ISBN 978-85-89109-06-2, p. 287-287, 2010.

97 PARENTEAU, N., SABOLINSKI, M., PROSKY, S., NOLTE, C., OLESON, M. KRIWET, K., AND BILBO, P. Biological and physical factors influencing the successful engraftment of a cultured human skin substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 52, p. 3-14, 1996.

98 PAUWELS, K., GIJSBERS, R., TOELEN, J., SCHAMBACH, A., WILLIARD-GALLO, K., VERHEUST, C., ZEGER, D., AND HERMAN, P. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr. Gene Ther.*, v. 9, p. 459-474, 2009.

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

100 PERONI, C.N., CECCHI, C.R., DAMIANI, D., SOARES, C.R.J., RIBELA, M.T.C.P., ARKATEN, R.R., AND BARTOLINI, P. High-level secretion of growth hormone by retrovirally transduced primary human keratinocytes: prospects for an animal model of cutaneous gene therapy. *Mol. Biotechnol.*, v. 34, p. 239-245, 2006.

101 PERONI, C.N., CECCHI, C.R., ROSAURO, C.W., NONOGAKI, S., BOCCARDO, E., AND BARTOLINI, P. Secretion of mouse growth hormone by transduced primary human keratinocytes: prospects for an animal model of cutaneous gene therapy. *J. Gene Med.*, v.10, p. 734-743, 2008.

102 PORTEUS, M.H., CONNELLY, J.P., AND PRUETT, S.M. A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *Plos Genet.*, v. 29, p. 1285-1292, 2006.

103 PRUD'HOMME, G.J., GLINKA, Y., KHAN, A.S., AND DRAGLIA-AKLI, R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr. Gene Ther.*, v. 6, p. 243-273, 2006.

104 RAPER, S.E., CHIRMULE, N., LEE, F.S., WIVEL, N.A., BAGG, A., GAO, G.P., WILSON, J.M., AND BATSHAW, M.L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.*, v. 80, p. 148-158, 2003.

105 RATANAMART, J., AND 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. 93-110, 2006.

106 RHEINWALD, J. G., AND GREEN, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*, v. 6, p. 317-330, 1975.

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

108 RIZZUTO, G., CAPPELLETTI, M., MAIONESE, D., SAVINO, R., LAZZARO, D., COSTA, P., MATHIESEN, J., CORTESE, R., CILIBERTO, G., LAUFER, R., LA MONICA, N., AND FATTORI, E. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 6417-6422, 1999.

109 ROBBINS, P.D., TAHARA, H., AND GHIVIZZANI, S.C. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.*, v. 16, p. 35-40, 1998.

110 ROCHAT, A., KOBAYASHI, K., AND BARRANDON, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, v. 76, p. 1063-1073, 1994.

111 ROSS, A.K., MORENO, S., LEDER, C., PAVLENKO, M., KING, A., AND PISA, P. Enhancement of cellular immune response to a prostate cancer DNA vaccine by intradermal electroporation. *Mol. Ther.*, v. 13, p. 320-327, 2006.

112 ROSS, A.K., ERIKSSON, F., WALTERS, D.C., PISA, P., AND KING, A.D. Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients. *Mol. Ther.*, v. 17, p. 1637-1642, 2009.

113 ROSAURO, C.W. **Altos níveis de expressão de hormônio de crescimento de camundongo em queratinócitos humanos visando a obtenção de um modelo animal de terapia gênica.** 2003. Tese (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

114 ROSELLI, E.A., MEZZADRA, R., FRITTOLE, M.C., MARUGGI, G., BIRAL, E., MAVILIO, F., MASTROPIETRO, F., AMATO, A., TONON, G., REFALDI, C., CAPPELLINI, M.D., ANDREANI, M., LUCARELLI, G., RONCAROLO, M.G., MARKTEL, S., AND FERRARI, G. Correction of β -thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO Mol. Med.*, v. 2, p. 315-328, 2010.

115 SAWAMURA, D., AKIYAMA, M., AND SHIMIZU, H. Direct injection of naked DNA and cytokine transgene expression: implications for keratinocyte gene therapy. *Clin. Exp. Dermatol.*, v. 6, p. 480-484, 2002.

116 SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., AND GRAHAM, F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.*, v. 16, p. 869-871, 2002.

117 SCHEIDEMANN, F., THERRIEN, J.P., VOGEL, J., AND PFÜTZNER, W. In vivo synthesis and secretion of erythropoietin by genetically modified primary human keratinocytes grafted onto immunocompromised mice. *Exp. Dermatol.*, v. 19, p. 289-297, 2009.

118 SIMONELLI, C., ZANUSSI, S., PRATESI, C., RUPOLO, M., TALAMINI, R., CAFFAU, TERESA BORTOLIN, M., TEDESCHI, R., BASAGLIA, G., MAZZUCATO, M., MANUELE, R., VACCHER, E., SPINA, M., TIRELLI, U., MICIELI, M., AND DE PAOLI, P. Immune recovery after autologous stem cell transplantation is not different for HIV-infected versus HIV-uninfected patients with relapsed or refractory lymphoma. *Clin. Infect. Dis.*, v. 50, p. 1672-1679, 2010.

119 SOARES, C.R., GOMIDE, F.L., UEDA, E.K., AND BARTOLINI, P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambda P_L promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng.*, v. 16, p. 1131-1138, 2003.

120 SOMIARI, S., GLASSPOOL-MALONE, J., DRABICK, J.J., GILBERT, R. A., HELLER, R., JAROSZESKI, M.J., AND MALONE, R.W. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol. Ther.*, v. 2, p. 178-187, 2000.

121 SONDERGAARD, M., DAGNAES-HANSEN, F., FLYVBJERG, .A, AND 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.

122 SPINK, J., AND GEDDES, D. Gene therapy progress and prospects: bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment. *Gene Ther.*, v. 11, p. 1611-1614, 2004.

123 STERN, M.M., AND BICKENBACH, J. R. Epidermal stem cells are resistant to cellular aging. *Aging Cell*, v. 6, p. 439-452, 2007.

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

125 SUZUKI, T., SHIN, B.C., FUJIKURA, K., MATSUZAKI, T., AND TAKATA, K. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electro-poration. *FEBS Lett.*, v. 425, p. 436-440, 1998.

126 TAICHMAN, L.B. Systemic replacement therapy from genetically modified epidermal keratinocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, v. 111, p. 206-210, 1999.

127 TENÓRIO, L.Z., SILVA, F.H., AND HAN, S.W. A potencialidade dos lentivectores na terapia gênica. *Rev. Bras. Clin. Med.*, v. 6, p. 260-267, 2008.

128 TERADA, N., HAMAZAKI, T., OKA, M., HOKI, M., MASTALERZ, D.M., NAKANO, Y., MEYER, E.M., MOREL, L., PETERSEN, B.E., AND SCOTT, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, v. 416, p. 542-544, 2002.

129 THERRIEN, J.P., KIM, S.M., TERUNUMA, A., QIN, Y., Pfützner, W., SCHEIDEMANN, F., AND VOGEL, J. A gene therapy approach for long-term normalization of blood pressure in hypertensive mice by ANP-secreting human skin grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 107, p. 1178-1183, 2010.

130 TIBÉRIO, R., MARCONI, A., FILA, C., FUMELLI, C., PIGNATTI, M., KRAJEWSKI, S., GIANNETTI, A., REED, J. C., AND PINCELLI, C. Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner. *FEBS Letters*, v. 524, p. 139-144, 2002.

131 TISCORNIA, G., SINGER, O., AND VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat. Protoc.*, v. 1, p. 241-245, 2006.

132 TRIPATHY, S.K., SVENSSON, E.C., BLACK, H.B., GOLDWASSER, E., MARGALITH, M., HOBART, P.M., AND LEIDEN, J.M. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 10876-10880, 1996.

133 VANBEVER, R., AND PREAT, V. In vivo efficacy and safety of skin electroporation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 35, p. 77-88, 1999.

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

135 WAGERS, A.J., AND WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v. 116, p. 639-648, 2004.

136 WALLACE, M., EVANS, B., WOODS, S., MOGG, R., ZHANG, L., FINNEFROCK, A.C., RABUSSAY, D., FONS, M., MALLEE, J., MEHROTRA, D., SCHÖDEL, F., AND MUSEY, L. Tolerability of two sequential electroporation treatments using medpulsar DNA delivery system (DDS) in healthy adults. *Mol. Ther.*, v. 17, p. 922-928, 2009.

137 ZAMPAGLIONE, I., ARCURI, M., CAPPELLETTI, M., CILIBERTO, G., PERRETTA, G., NICOSIA, A., LA MONICA, N., AND FATTORI, E. In vivo DNA gene electro-transfer: a systematic analysis of different electrical parameters. *J. Gene Med.*, v.7, p. 1475-1481, 2005.

138 ZHANG, L., NOLAN, E., KREITSCHITZ, S., AND RABUSSAY, D.P. Enhanced delivered of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1572, p.1-9, 2002.