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

Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região downstream, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica

ENIO APARECIDO ZACARIAS

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

**Orientadora:
Profa. Dra. Cibeles Nunes Peroni**

**São Paulo
2020**

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

Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região downstream, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica

ENIO APARECIDO ZACARIAS

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

Orientadora:
Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni

Versão Corrigida
Versão original disponível no IPEN

São Paulo
2020

Fonte de Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

ZACARIAS, E. A. ***Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região downstream, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica***. 2020. 72 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zacarias, Enio Aparecido

Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região downstream, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica / Enio Aparecido Zacarias; orientadora Cibele Nunes Peroni. -- São Paulo, 2020.

72 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Terapia Gênica. 2. Hormônio de Crescimento Humano. 3. Eletrotransferência. 4. DNA Genômico. 5. DNA Complementar. I. Peroni, Cibele Nunes, orient. II. Título.

Agradecimentos:

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;

À Dra. Cibele Nunes Peroni, por todo apoio, acadêmico e pessoal, ao longo desses mais de dois anos;

Ao Dr. Paolo Bartolini, por tudo que ensinou, apoiou e batalhou por nós;

À minha grande amiga Alissandra, que sempre estava lá para ajudar e apoiar no que fosse preciso, seja no laboratório ou fora dele;

Ao Gustavo, por toda ajuda, ensinamento e dias mais engraçados na sua companhia;

Aos alunos de IC e treinamento técnico, Rafael, Darle e Vanessa, por todo apoio técnico nos laboratórios, companhia e conversas, tornando os dias em que tudo ia errado, mais fáceis;

À Eliana, que antes de mim, desenvolveu um grande projeto na terapia gênica, e mesmo após sair do grupo, continuou dando todo suporte e se tornou uma grande amiga;

À Thaís S, por ser uma pessoa sempre disposta a ajudar e ter um alto-astral que contagia;

À Thaís C, que sempre estava disposta a dividir seus conhecimentos e sempre tinha uma história legal para contar;

Ao Felipe, por toda ajuda e apoio, principalmente na cultura celular;

À Dra. Regina, por todo apoio que me deu, principalmente no início do meu mestrado, onde foi mais difícil;

Aos amigos Johnny, Míriam e Junqueira pelo apoio teórico e prático nos laboratórios;

Aos alunos e ex-alunos Eliza, Claudinha, Nélío, Carol, Renata e Flávia, que me ajudaram, mesmo que não tenhamos tido muito tempo juntos no CEBIO;

À Neide, Mara e Patrick, pelo apoio técnico no Biotério do IPEN;

Ao Dr. Carlos, por cuidar do CEBIO e sempre procurar o melhor para o centro;

À minha família, por todo apoio, compreensão e amor que recebi, não só durante o meu mestrado, mas sempre;

A todos os outros amigos(as) da vida e às pessoas que amo;

Ao IPEN, por ter me aceito no Programa de Pós-Graduação e ter me dado a oportunidade de evoluir tanto academicamente;

A todos que contribuíram, mesmo que de forma indireta e mínima, para que tudo desse certo.

Toda a vida do homem tem necessidade de ordem e de adaptação.

Protágoras

Resumo

ZACARIAS, E. A. Comparação de eficiência entre vetores contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região *downstream*, do hormônio de crescimento humano na terapia gênica, Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A deficiência de hormônio de crescimento (GHD) é geralmente tratada com injeções repetidas do hormônio recombinante. Nosso grupo tem trabalhado com uma alternativa para o tratamento padrão da GHD, utilizando um modelo de terapia gênica baseado em uma única injeção de DNA plasmidial (*naked DNA*) contendo a sequência genômica (gDNA) do hormônio de crescimento humano (hGH). Utilizamos uma abordagem *in vivo* na qual o vetor de expressão é administrado em camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*), seguido por eletrotransferência.

Em estudos anteriores, obtivemos níveis elevados de hGH no soro desses camundongos (~ 20 ng/mL) com uma aproximação de crescimento em relação ao camundongo normal (*catch-up growth*) de ~ 70% para o peso corporal e de ~ 80% para o comprimento do fêmur, utilizando um vetor plasmidial contendo o gDNA do hGH com o promotor de ubiquitina-C. Por outro lado, em trabalho anterior tivemos uma indicação de que a sequência complementar (cDNA) poderia ter uma vantagem sobre o gDNA em nosso protocolo de terapia gênica.

No presente trabalho, nosso objetivo foi realizar um estudo comparativo entre vetores contendo as sequências genômica (gDNA), complementar (cDNA) ou complementar acrescida da região 3' (cDNA 3') do hGH.

Primeiro, os vetores foram analisados quanto aos níveis de expressão *in vitro* mediante transfecção de células HEK-293. Os níveis de hGH foram mensurados por ELISA e atingiram $20,96 \pm 4,28$ µg/mL para gDNA, $1,59 \pm 0,42$ µg/mL para cDNA e $3,13 \pm 0,71$ µg/mL para cDNA+3', após 72 h da transfecção. Uma segunda quantificação foi realizada por RP-HPLC e o padrão de expressão foi o mesmo da quantificação por ELISA.

Em seguida, foram realizados bioensaios administrando esses vetores em camundongos *lit/scid*, via eletrotransferência, no músculo tibial anterior. O primeiro bioensaio foi de 7 dias e, ao final do experimento, os níveis de expressão de hGH foram estatisticamente diferentes somente entre os grupos gDNA/cDNA+3', sendo que o primeiro apresentou o maior nível de expressão. Quanto aos níveis de mIGF-1, não houve diferença estatística entre os grupos gDNA/cDNA+3', apenas esses dois em comparação com o cDNA e, mais uma vez, o grupo gDNA apresentando o maior nível de expressão.

Foi realizado um segundo bioensaio, agora de 30 dias, no qual, além dos níveis de hGH e mIGF-1, também foram determinados os incrementos do peso corporal e do comprimento do corpo total, da cauda e dos fêmures. Ao final deste bioensaio, os níveis de expressão de hGH não apresentaram diferença estatística entre os grupos de DNA. Por outro lado, os maiores níveis de expressão de mIGF-1 foram obtidos nos grupos gDNA e cDNA+3'.

Finalmente, as porcentagens de *catch-up growth* foram calculadas e os melhores resultados foram novamente para o gDNA, com variações de 16,6 a 32,4 % para os parâmetros avaliados. Esses resultados indicam, portanto, que o plasmídeo contendo a sequência gDNA é mais eficiente para o estímulo de expressão do IGF-1 e incremento na porcentagem de recuperação dos parâmetros analisados do que as outras sequências de DNA utilizadas.

Em conclusão, os resultados alcançados neste projeto são opostos aos esperados por nós, pois acreditávamos que o cDNA poderia apresentar um maior nível de expressão quando comparado ao gDNA, em nosso modelo de terapia gênica. Pelo contrário, o gDNA apresentou os melhores resultados para hGH, mIGF-1 e *catch-up growth*, seguidos pelos grupos cDNA+3' e cDNA. O fato do cDNA+3' ter apresentado melhores resultados que o cDNA provavelmente é devido à região 3', a qual é conhecida por conter sequências que podem aumentar a eficiência da transcrição. Portanto, continuaremos a utilizar o vetor contendo o gDNA em nossos estudos de terapia gênica.

Palavras-chave: terapia gênica, DNA genômico (gDNA), DNA complementar (cDNA), hormônio de crescimento humano (hGH), eletrotransferência, camundongo anão imunodeficiente.

Abstract

ZACARIAS, E. A. Comparison of efficiency between vectors containing the genomic and the complementary sequences, with or without the downstream region, of the human growth hormone in gene therapy, Master's Thesis – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Growth hormone deficiency (GHD) is usually treated with repeated injections of the recombinant hormone. Our group has been working with an alternative to the standard treatment of GHD using a gene therapy model based on a single injection of plasmid DNA (*naked DNA*) containing the genomic sequence (gDNA) of human growth hormone (hGH). We are using an *in vivo* approach in which the expression vector is administered into immunodeficient dwarf (*lit/scid*) mice, followed by electrotransference.

In previous studies, elevated levels of hGH in mice serum (~ 20 ng/mL) with an approximation of growth to normal mice (catch-up growth) of ~ 70% for body weight and of ~ 80% for femur length were obtained, using a plasmid containing the gDNA of hGH with the ubiquitin-C promoter. On the other hand, in previous work we had an indication that the complementary sequence (cDNA) could have an advantage over gDNA in our gene therapy protocol.

In the present work, our objective was to carry out a comparative study of efficiency between vectors containing the genomic (gDNA), the complementary (cDNA) or the complementary sequence with the 3' region (cDNA 3') of hGH

First, the vectors were analyzed for *in vitro* expression levels by transfecting HEK-293 cells. The levels of hGH were measured by ELISA and reached 20.96 ± 4.28 µg/mL for gDNA, 1.59 ± 0.42 µg/mL for cDNA and 3.13 ± 0.71 µg/mL for cDNA+3', after 72 hours from transfection. A second quantification was carried out by RP-HPLC and the expression pattern was maintained as in the quantification by ELISA.

Then, bioassays were performed administering these vectors into *lit/scid* mice, via electrotransference, in the tibialis anterior muscle. The first one was a 7-

day bioassay and, at the end of the experiment, the hGH expression levels were statistically different only between gDNA/cDNA+3' groups, with the first group presenting the highest expression level. For the mIGF-1 levels, there was no statistical difference between gDNA/cDNA+3' groups, only these two compared to the cDNA and, again, the gDNA group showing the highest expression level.

A second bioassay, now with 30-days duration, was carried out, in which, in addition to the levels of hGH and mIGF-1, increments of body weight and total body length, tail and femurs were also determined. At the end of this bioassay, the levels of hGH expression showed no statistical difference between the DNA groups. On the other hand, the highest levels of mIGF-1 expression were obtained in the gDNA and cDNA+3' groups

Finally, the catch-up growth percentages were calculated and the best results were again for the gDNA, with a range of 16.6 to 32.4 % for the evaluated parameters. These results indicate, therefore, that the plasmid containing the gDNA sequence is more efficient for stimulating IGF-1 expression and reaches better catch-up growth percentages of the evaluated parameters than the other DNA sequences used.

In conclusion, the results achieved in this project are opposite to those expected by us, as we believed that cDNA could have a higher expression level when compared to gDNA in our gene therapy model. On the contrary, gDNA showed the best results for hGH, mIGF-1 and catch-up growth, followed by cDNA+3' and cDNA. The fact that cDNA+3' had presented better results than cDNA is probably due to the 3' region, that is known to contain sequences that can increase the efficiency of transcription. Therefore, we will continue to use the vector containing the gDNA in our gene therapy studies.

Key words: gene therapy, genomic DNA (gDNA), complementary DNA (cDNA), human growth hormone (hGH), electrotransference, immunofecient "*little*" mice.

Lista de abreviaturas e siglas

cDNA	sequência complementar de DNA
cDNA+3'	sequência complementar de DNA acrescida da região <i>downstream</i>
CG	<i>catch-up growth</i>
cm	centímetros
CMV	citomegalovírus
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
gDNA	sequência genômica de DNA
GH	hormônio de crescimento
GHD	deficiência do hormônio de crescimento
GHRH	hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRHR	receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento
hGH	hormônio de crescimento humano
HI	hialuronidase
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
kb	kilobases
<i>lit/lit</i>	camundongos anões
<i>lit/scid</i>	camundongos anões e imunodeficientes
mA	miliampere
mGH	hormônio de crescimento murino
mIGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 murino
mL	mililitros
mm	milímetros
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
ms	milissegundos
ng	nanogramas
nm	nanômetros

pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pg	picogramas
r-hGH	hormônio de crescimento humano recombinante
RNA	ácido ribonucleico
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
rpm	rotações por minuto
U	unidades
UBI	promotor da ubiquitina C
µg	microgramas
µL	microlitros
V	volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hormônio de crescimento e IGF-1	15
1.2. Deficiência de hormônio de crescimento (GHD)	17
1.3 Terapia gênica	18
1.4 Vetor plasmidial (<i>Naked DNA</i>)	20
1.5 Eletroporação	21
1.6 Últimos avanços	23
2 OBJETIVO	24
2.1 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL	25
3.1 Animais	25
3.2 Plasmídeos	25
3.3 Equipamentos e acessórios principais	26
3.4 Principais reagentes para biologia molecular	27
3.5 Principais reagentes para cultura celular	28
3.6 Equipamentos e materiais utilizados na eletrotransferência de DNA plasmidial	29
3.7 Sistemas utilizados nas determinações de hGH e mIGF-1	29
4 MÉTODOS	30
4.1 Construção dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA+3'	30
4.2 Transformação de bactérias e amplificação dos plasmídeos	31
4.3 Transfecção de células HEK-293 para análise da expressão de hGH <i>in vitro</i>	31
4.4 Genotipagem dos camundongos	32
4.5 Eletrotransferência	33

4.6 Bioensaios em camundongos <i>lit/scid</i>	33
4.7 Cálculo da porcentagem de recuperação de crescimento (<i>catch-up growth</i>)..	34
4.8 Determinação de hGH por ELISA e RP-HPLC	35
4.9 Determinação de mIGF-1	35
4.10 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA	37
5.2 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA+3'	40
5.3 Confirmação da obtenção dos plasmídeos em sua forma pura	44
5.4 Expressão de hGH <i>in vitro</i> por células HEK-293.....	45
5.5 Análise dos níveis de expressão de hGH por RP-HPLC.....	46
5.6 Genotipagem de camundongos para bioensaio	48
5.7 Bioensaio de curta duração (7 dias) em camundongos <i>lit/scid</i>	50
5.8 Bioensaio de longa duração (30 dias) em camundongos <i>lit/scid</i>	52
5.8.1 Níveis de expressão de hGH e mIGF-1 ao final do bioensaio de 30 dias	52
5.8.2 Variação do peso corpóreo dos camundongos	54
5.8.3 Variação do comprimento total do corpo	56
5.8.4 Variação do comprimento da cauda	57
5.8.5 Variação do comprimento dos fêmures	58
5.8.6 Cálculo do <i>catch-up growth</i>	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônio de crescimento e IGF-1

O hormônio de crescimento (GH) é secretado pelas células somatotróficas da glândula hipófise anterior, sendo regulado por diversos fatores, entre eles o hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). Entre suas funções, estão as regulações do crescimento tecidual, do metabolismo de glicose, de lipídeos e ósseo (Hartman, 2000; Alba et al., 2005; Gunawardane et al., 2015). A liberação do GH ocorre durante o dia em forma de pulsos, sendo que durante o ciclo circadiano o maior pico de secreção é durante a noite (Gunawardane et al., 2015).

O GHRH, produzido pelo hipotálamo, age sobre as células somatotróficas da hipófise anterior e estimula o receptor transmembrana, o que resulta na transcrição e secreção do GH (Hartman, 2000; Gunawardane et al., 2015). Mutações no gene codificante para o receptor do GHRH (GHRHR) podem levar à deficiência do hormônio de crescimento (GHD), proporcionando uma baixa estatura no indivíduo (Gunawardane et al., 2015; Gregor et al., 2016).

O GH se liga ao seu receptor, porém também atua diretamente na liberação do IGF-1, que é um peptídeo produzido pelo fígado e tecidos periféricos (Gunawardane et al., 2015).

A produção de IGF-1 pelo fígado é mediada pelo GH e corresponde a cerca de 75 % da síntese total, enquanto a produção pelos tecidos periféricos é mediada tanto pelo GH, quanto por fatores parácrinos dependentes do tecido (Gunawardane et al., 2015). Sendo assim, deficiência na produção de GH também afeta a produção de IGF-1.

Entre os efeitos biológicos do IGF-1, esse desempenha um importante papel no crescimento, estimulando a divisão das células primárias da epífise dos ossos longos; remodelação tecidual óssea, diferenciação celular em tecido

adiposo, crescimento e síntese de proteínas no tecido muscular, metabolismo de ácidos graxos, além de controlar a liberação do GH por meio de *feedback* negativo, pois quando há um aumento da sua concentração, esse atua diretamente no hipotálamo, promovendo a liberação da somatostatina, a qual inibe a liberação de GH na hipófise anterior (Clemmons, 2012; Romero et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1: Esquema de liberação do GH e *feedback* negativo mediado pelo IGF-1 (Modificado de Gunawardane et al., 2015).

1.2. Deficiência de hormônio de crescimento (GHD)

A deficiência de hormônio de crescimento (GHD) pode ser causada por fatores como herança genética e disfunção hipofisária ou hipotalâmica (Khamaisi et al, 2007). Pacientes com GHD demonstram problemas de desenvolvimento desde a infância, apresentando um pobre crescimento linear, que piora com o passar dos anos, provocando até mesmo o atraso do crescimento da dentição secundária. Na fase adulta, os efeitos da GHD incluem aumento do tecido adiposo, diminuição da massa magra, aparência facial mais jovem do que o comum para a idade e voz aguda, falta de concentração, perda de memória, resistência à insulina, aumento de fatores de riscos cardiovasculares, entre outros (Alba et al., 2005; Milleta et al., 2017).

Com a tecnologia do DNA recombinante, a produção de hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH) se tornou possível, melhorando o método de produção desse hormônio para pacientes acometidos pela GHD, uma vez que agora é possível a produção praticamente ilimitada de r-hGH com garantia de um alto nível de pureza. Esse avanço na terapia de pacientes com GHD marca um grande passo para a qualidade de vida e do tratamento, já que antes era necessário obter o hormônio por extração hipofisária, o qual era um método relativamente mais caro, trabalhoso, e que não garantia a qualidade e segurança daquele hormônio que seria administrado nos pacientes. Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) do Governo Federal disponibiliza o tratamento com r-hGH para pacientes que se enquadrem na Portaria Conjunta nº 28, de 30 de Novembro de 2018 do Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde e a Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos, porém o preço total do tratamento varia em torno de dez mil dólares por centímetro de incremento do paciente, podendo variar de acordo com a severidade da deficiência do paciente. Além disso, esse método de tratamento com r-hGH ainda enfrenta algumas outras limitações como, por exemplo, a necessidade de injeções diárias (dependendo do caso do paciente), o que acaba provocando um grande desconforto e pode

influenciar na aderência ao tratamento, principalmente se tratando daqueles pacientes na fase infantil ou pré-puberdade (Howard, et al. 2013; Lima Filha, 2016, Ministério da Saúde, 2018).

1.3 Terapia gênica

Uma alternativa ao tratamento com r-hGH é a terapia gênica, a qual consiste em realizar a transferência gênica por meio de um vetor para as células somáticas do paciente. Esse tipo de tratamento possui potenciais vantagens em relação ao tratamento com r-hGH como, por exemplo, diminuir o número de injeções que o paciente precisa receber ao longo de sua vida, evitar o trabalhoso e dispendioso processo de purificação do hormônio (o que poderia diminuir os custos totais do tratamento), além de proporcionar um método de liberação do hormônio mais próximo ao natural, uma vez que a produção de GH ocorrerá pelas células do próprio paciente. A terapia gênica é, portanto, um procedimento mais seguro e possivelmente mais barato, no qual ocorre apenas a entrega de moléculas de DNA, sem a necessidade de utilizar outros adjuvantes químicos como conservantes e estabilizantes, além de haver a possibilidade do mecanismo de liberação da proteína ser mais próximo do fisiológico (Khamaisi et al., 2007; Zaninelli et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Wang et al., 2013, Cervia et al., 2018).

A terapia gênica visa, portanto, tratar, curar ou até mesmo prevenir doenças editando, adicionando ou substituindo genes defeituosos ou ausentes no paciente ou mudando o padrão de expressão de seus genes inatos. É uma metodologia que pode ser considerada uma “cura” definitiva para vários problemas genéticos, pois uma vez corrigida a mutação do DNA do paciente, esse, teoricamente, irá desempenhar o processo fisiológico normalmente, não necessitando da contínua intervenção terapêutica, assim como no caso da administração de hormônios recombinantes, que deve ocorrer por um longo período da vida, ou até mesmo

durante ela toda. Há muitos protocolos clínicos de terapia gênica sendo desenvolvidos mundialmente, e entre eles estão aqueles para tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, infecciosas e autoimunes (Van Gaal et al., 2006; Leung et al., 2010; Wang et al., 2013; Ginn et al., 2018).

Existem dois métodos de terapia gênica, o *ex vivo* e o *in vivo* (Figura 2). A terapia gênica *ex vivo* consiste em retirar células de um tecido ou órgão do paciente, modificá-las geneticamente *in vitro* por meio de um vetor contendo o gene de interesse, amplificá-las e enxertá-las no paciente novamente. Na terapia *in vivo*, o vetor é administrado no paciente geralmente por meio de injeções e a sequência de DNA é incorporada pelas células-alvo para que essas então expressem o gene de interesse (Peroni et al., 2005; Lima Filha, 2016).

Figura 2: Ilustração esquematizando a diferença entre terapia gênica *in vivo* e *ex vivo* (Lima Filha, 2016).

1.4 Vetor plasmidial (*Naked DNA*)

Nosso grupo tem estudado estratégias de terapia gênica *in vivo*, baseadas na administração direta de vetores constituídos de DNA plasmidial (*naked DNA*), seguida de eletrotransferência ou eletroporação. Esses vetores consistem em uma molécula de DNA circular, o plasmídeo, encontrado principalmente em bactérias. Possuem geralmente algumas regiões em comum, sendo elas: O gene que será expresso; o promotor que regulará a expressão desse gene; um gene marcador de seleção, o qual permitirá escolher colônias de bactérias que possuem o plasmídeo em detrimento àquelas que não possuem; e um sítio de origem de replicação (Figura 3), o qual permitirá que esse plasmídeo seja clonado em larga escala em bactérias e posteriormente purificado em sistemas específicos para clonagem de material genético. Nos nossos trabalhos de terapia gênica, temos utilizado atualmente plasmídeos contendo as sequências genômicas do GH humano ou murino, regulados pelo promotor da Ubiquitina-C (UBI) (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014; Higuti et al., 2016; Cecchi et al., 2017).

diversos protocolos de terapia gênica dos mais diferentes tipos de enfermidades, entre eles anemia crônica, diabetes mellitus e infecções da mucosa intestinal (Lima Filha, 2016).

Figura 4: Vetores utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica pelo mundo até o ano de 2017 (Gin et al, 2018).

Em nosso modelo de terapia gênica baseada em eletroporação, inicialmente é administrada a enzima hialuronidase (HI) no músculo tibial anterior dos camundongos. Essa enzima catalisa a hidrólise do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo viscoso da matriz extracelular, facilitando a passagem das moléculas do plasmídeo e melhorando a taxa de incorporação dessas pelas células musculares. Após 30 minutos da aplicação da HI em uma concentração de 20 U/20 μ L, o DNA plasmidial é aplicado em duas injeções em cada músculo, na concentração de 50 μ g/20 μ L, e a aplicação da eletroporação é realizada a uma voltagem de 375 V/cm em 3 pulsos com duração de 25 ms e intervalo de 0,5 s (Lima Filha, 2016).

1.6 Últimos avanços

Após a padronização dos parâmetros da eletroporação, tais como quantidade e volume de DNA plasmidial, músculo alvo, quantidade de enzima hialuronidase, voltagem, número e intervalo de pulsos, foram obtidos elevados níveis de expressão *in vivo* de GH de ~ 20 ng/mL, sendo que camundongos normais expressaram $4,5 \pm 1,5$ ng/mL; e de aproximação de crescimento dos camundongos anões em relação aos normais (*catch-up growth*) de 70 a 80% para o aumento de peso corpóreo e do comprimento dos fêmures (Lima Filha, 2016). Esses resultados foram alcançados por meio de utilização de um vetor que possui a sequência genômica do mGH sob o controle do promotor da ubiquitina-C (pUC-UBI-mGH). A utilização de vetores contendo o gDNA do GH em nosso modelo de terapia gênica é justificada, pois a região *downstream* (3') de sequências genômicas é muitas vezes conhecida por conter sequências complementares do sinal de poliadenilação (poli A), as quais podem melhorar a eficiência do RNA mensageiro (Proudfoot, 2011).

Porém, em outro trabalho, verificamos em ensaio preliminar que o uso do plasmídeo pcDNA 3.1 com promotor de citomegalovírus (CMV), contendo a sequência de DNA complementar (cDNA) do gene do hGH apresentou maiores níveis de expressão do hormônio *in vivo* em relação ao mesmo vetor contendo a sequência do DNA genômico (gDNA) do hGH (Oliveira, 2010). Isso poderia ocorrer devido a uma maior facilidade de processamento do cDNA em relação ao gDNA pelo tecido muscular, uma vez que o cDNA não possui íntrons, além desse resultar em um vetor de tamanho menor, o qual poderia ser mais facilmente incorporado pelas células.

Devido a essas evidências, faz-se necessária a comparação de vetores contendo as sequências gDNA e cDNA (acrescida ou não da região *downstream* 3' do GH) em nosso modelo de terapia gênica, sob regulação de um mesmo promotor, para verificarmos qual dessas sequências melhor estimularia a síntese de GH e a melhora dos parâmetros de crescimento.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma comparação da eficiência entre vetores de expressão contendo a sequência genômica e complementar, acrescida ou não da região *downstream* (3'), do hormônio de crescimento humano (hGH), após eletrotransferência no músculo tibial anterior de camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*).

2.1 Objetivos específicos

- Construir os plasmídeos com o cDNA e o cDNA+3' do hGH (pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA+3'), uma vez que já possuíamos o vetor com o gDNA (pUC-UBI-hGH-gDNA);
- Analisar a expressão de hGH *in vitro* por meio da transfecção de células HEK-293 com esses três vetores, além de realizar um teste de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC);
- Realizar bioensaios *in vivo* administrando os vetores no músculo tibial anterior de camundongos *lit/scid*, seguido de eletrotransferência, para a determinação dos níveis de expressão de hGH e de mIGF-1, do peso corpóreo, dos comprimentos total do corpo (*nose-to-tail*), da cauda e dos fêmures e cálculo do *catch-up growth*.

3 MATERIAL

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos anões homozigotos para a mutação no gene do receptor de GHRH e imunodeficientes (*lit/scid*). A matriz desses animais foi obtida do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA) e uma colônia é mantida no Biotério do IPEN (Bellini et al., 2003; Peroni et al., 2008).

Os animais utilizados nos experimentos tinham aproximadamente 40 dias de idade e, para confirmar a presença da mutação *little*, foi realizada a genotipagem dos mesmos, antes dos bioensaios. Camundongos *scid* não tratados foram utilizados como controle positivo de crescimento.

A utilização dos camundongos nesse projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação (CEUA-IPEN), registrado com o número 184/17.

3.2 Plasmídeos

- pUC-UBI-hGH-gDNA: plasmídeo que possui o promotor da ubiquitina-C na posição de - 1464 a - 15 pb, e a sequência genômica do hGH de 2152 pb, clonada entre os sítios das enzimas *Bam HI* e *Eco RI*. Esse vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Thomas G. Jensen do Departamento de Biomedicina da Universidade de Aarhus, Dinamarca (Dagnaes-Hansen, 2002), e tem sido utilizado em outros trabalhos do nosso grupo (Oliveira, 2010; Higuti et al., 2012 e 2016).

- pUC57-hGH: plasmídeo construído pela empresa *Biomatix* (Ontário, Canadá), contendo o inserto sintético do hGH-cDNA de 832 pb entre os sítios de restrição *Bam HI* e *Eco RI*, tendo como molde a sequência disponível no *GenBank* sob

número de acesso NM_000515.4. Desse plasmídeo foi retirado o cDNA do hGH que foi utilizado posteriormente para a obtenção dos outros dois vetores: pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA+3', cujas construções estão detalhadas no item 4.1 dos Métodos.

3.3 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258 – FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162 – MARCONI (São Paulo, SP, Brasil);
- Autoclave vertical, modelo 103 – FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Banho-maria, modelo 146, FANEN (São Paulo, SP, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurique, Suíça);
- Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurique, Suíça);
- Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B – SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5810R, EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- Coluna C4 Grace Vydac 17/1 + Si60 18/1;
- Contador gama automático 2470 Wizard 2, PERKIN ELMER (Waltham, Massachusetts, EUA);
- Destilador de água, modelo 016, FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro, modelo Ultraspec 2100 pro, AMERSHAM BIOSCIENCES (Uppsala, Suécia);
- Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR IMAGE SYSTEMS (Jerusalém, Israel);

- Fonte de alta tensão para eletroforese, ECPS 3000/150, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- Fonte de alta tensão para eletroforese, EPS 600, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- 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);
- HPLC SPD-20A – SHIMADZU DO BRASIL LTDA (São Paulo, SP, Brasil);
- *In Vivo Imaging System FX PRO* – BRUKER CORPORATION (Billerica, Massachusetts, USA);
- Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH (Bethesda, EUA);
- Microcentrífuga, modelo 5415P - EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- Micropipetas LABMATE SOFT Monocanal de volume variável: 10µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL - HTL (Varsóvia, Polônia);
- Nanodrop - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- Ponteiras sem filtro, volumes de 10 a 1000 µL – AXYGEN (Union, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q plus – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Termociclador Veriti 96 poços - APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City, CA, EUA);
- Tubos de poliestireno para imunoensaios (7,5 x 1,2 cm) - EMTEL (São Paulo, Brasil).

3.4 Principais reagentes para biologia molecular

- Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- *Agarose Gel Extraction Kit* – CELLCO BIOTEC (São Carlos, São Paulo)
- Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);

- Bactérias competentes da linhagem *E. coli* DH5α;
- Brometo de etídio – LKB – PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá) e THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- hGH recombinante – BLAU FARMACÊUTICA S.A. (Cotia, SP, Brasil);
- Sistema para extração de DNA – REDExtract-NAmp Tissue™ PCR – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA);
- Sistema para purificação de DNA *Xtra Midi/Maxi* – NUCLEOBOND – MACHEREY-NAGEL (Duren, Alemanha);
- Marcador de peso molecular de 100 pb e 1 kb Gene Ruler™ – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA) e FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- Primers – EXXTEND BIOTECNOLOGIA LTDA (Paulínia, SP, Brasil);
- Sistema para purificação de DNA *Xtra Midi/Maxi* - NUCLEOBOND - MACHEREY-NAGEL (Düren, Alemanha);
- Triptona - Bacto™ Tryptone – BECTON DICKINSON (Sparks, MD, EUA);
- T4 DNA Ligase - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA).

3.5 Principais reagentes para cultura celular

- Antibióticos penicilina/estreptomicina – VITROCELL EMBRIOLIFE (Campinas, SP, Brasil);
- Meio RPMI-1640 - SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA);
- Soro fetal bovino – VITROCELL EMBRIOLIFE (Campinas, SP, Brasil);
- Tripsina-EDTA com vermelho de fenol – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- Xfect™ – TAKARA BIO (Mountain View, CA, EUA).

3.6 Equipamentos e materiais utilizados na eletrotransferência de DNA plasmidial

- Eletrodo do tipo paquímetro, utilizando uma distância de 3 mm entre as placas de 1,0 x 1,0 cm – BTX (Holliston, MA, EUA);
- Eletroporador ECM-830 – BTX (Holliston, MA, EUA);
- Gel eletrocondutor Flexor – FLEXOR (Sertãozinho, SP, Brasil);
- Hialuronidase - Hyalozima 2.000 UTR – APSEN (São Paulo, SP, Brasil);
- Máquina de corte elétrico para barba - GAMA ITALY (Bolonha, Itália);
- Paquímetro digital – MITUTOYO (Suzano, SP, Brasil);
- Quetamina – *Cetamin* – SYNTEC (Hortolândia, SP, Brasil);
- Seringas BD Ultra – Fine II – BECTON DICKINSON (Franklin Lakes, NJ, EUA);
- Seringas descartáveis de 1 mL – INJEX (Ourinhos, SP, Brasil);
- Xilazina - *Xilazin* – SYNTEC (Hortolândia, SP, Brasil).

3.7 Sistemas utilizados nas determinações de hGH e mIGF-1

- *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA) – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- *Quantikine ELISA mouse-rat IGF-1 kit* – R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN, EUA).

4 MÉTODOS

4.1 Construção dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA+3'

Para a obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA, o inserto contendo o gene do hGH-cDNA foi retirado do plasmídeo pUC57-hGH utilizando as enzimas *Bam HI* e *Eco RI*. A sequência do hGH-gDNA contida no plasmídeo pUC-UBI-hGH-gDNA foi também retirada com as mesmas enzimas. Uma corrida eletroforética em gel de agarose 1 % foi realizada para separar os plasmídeos dos insertos. As bandas correspondentes ao pUC-UBI de 4215 pb e ao hGH-cDNA de 832 pb foram purificadas utilizando o sistema comercial *Agarose Gel Extraction Kit*. O inserto hGH-cDNA foi então inserido no plasmídeo pUC-UBI por meio de uma reação de ligase clássica. Após a construção, foi feita uma análise de restrição com as enzimas *Bam HI* e *Eco RI* para uma verificação preliminar da presença do inserto, seguida de sequenciamento realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da USP (CEGH-CEL).

Para a construção da segunda variante do plasmídeo contendo o cDNA, o pUC-UBI-hGH-cDNA+3', foram realizadas reações de restrição nos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA com as enzimas *Xba I* e *Bgl II*. O cDNA-hGH de 553 pb e o pUC-UBI (originário do pUC-UBI-hGH-gDNA) de 5000 pb (contendo a região 3' de 785 pb) passaram por reação de ligação, e após a construção, por análise eletroforética e sequenciamento, assim como a primeira construção.

4.2 Transformação de bactérias e amplificação dos plasmídeos

Após a obtenção dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA+3', os mesmos foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5 α . As bactérias foram cultivadas em meio LB com 1% de ampicilina para seleção das colônias transformadas e os clones positivos foram isolados.

Os plasmídeos foram purificados utilizando o sistema comercial *DNA Xtra Midi/Maxi* e quantificados por leitura espectrofotométrica. Foi feita análise de restrição com as enzimas *Bam HI* e *Eco RI* para confirmar a presença dos respectivos insertos em cada plasmídeo, antes da utilização das preparações de DNA plasmidial nos bioensaios.

4.3 Transfecção de células HEK-293 para análise da expressão de hGH *in vitro*

Células HEK-293 são células embrionárias originárias de rim humano que foram modificadas com adenovírus. Essas células apresentam facilidade de cultivo por longos períodos, transfecção simples e eficiente com diversos tipos de vetores e proporcionam altos níveis de expressão transiente da proteína transgênica (Oliveira, 2010).

Células HEK-293 aderentes foram mantidas em incubadoras a 5% de CO₂ e 37 °C, em meio RPMI-1640 com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), expandidas em garrafas para cultura celular de 25, 75 e 160 cm² e, posteriormente, foram transferidas para placas de 6 poços um dia antes do início do ensaio (1.10⁶ células/poço). Para realizar as subculturas, as células foram incubadas com 0,5 mL de tripsina-EDTA a 0,25% por 3 minutos a 37°C.

As células foram transfectadas utilizando o polímero comercial Xfect™ da *Takara Bio*, e o experimento foi dividido em quatro grupos (n = 3/grupo): gDNA, cDNA, cDNA+3' e controle negativo. A cada grupo de células foram adicionados 50 µg do respectivo plasmídeo em cada poço, enquanto que nas do grupo controle foi utilizado apenas o polímero. Após 48 horas da transfecção, os meios foram coletados e os níveis de expressão de hGH determinados por ELISA. Um novo meio RPMI foi adicionado e, após 96 horas, coletado novamente para determinar os níveis de expressão por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). Essa segunda adição de meio RPMI ocorreu na ausência de SFB e antibiótico, pois esses interfeririam na detecção do hormônio no RP-HPLC.

4.4 Genotipagem dos camundongos

Foram realizadas genotipagens de camundongos nascidos a partir do acasalamento de machos homozigotos para a mutação no gene GHRHR (*lit/lit*) e fêmeas heterozigotas (*lit/+*) para o mesmo gene. Para isto, foram coletadas amostras de tecido da orelha dos camundongos para extração de DNA, utilizando o kit *REDEExtract-NAmp Tissue™ PCR*, seguindo instruções do fabricante. Após a extração do DNA, as amostras foram amplificadas por PCR, utilizando 35 ciclos, com os seguintes parâmetros: denaturação a 94 °C (30 s); anelamento a 56 °C (30 s) e extensão a 72° C (1 min).

Foram utilizados *primers* específicos para a região do gene do GHRHR, onde ocorre a mutação que causa o nanismo em nosso modelo animal, com as seguintes sequências:

- *primer forward*: GATGCCCTGGGACCTGGG;
- *primer reverse*: ACCAGAAGGAACCACATGCT.

Uma reação de restrição com a enzima BseG I foi realizada para cada amostra, pois essa enzima reconhece e cliva a região não mutada, então caso o camundongo seja anão, a enzima não reconhece a sequência e não realiza a

clivagem. Por último, as amostras foram submetidas à análise eletroforética em gel de agarose a 3%, 80 V, 150 mA por 1h30min.

4.5 Eletrotransferência

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. Os pelos da região do músculo tibial anterior direito e esquerdo foram retirados, onde foi injetada a enzima HI na concentração de 20 U/20 µL. Esta enzima facilita a entrada do plasmídeo nas células musculares, pois catalisa a hidrólise do ácido hialurônico da matriz extracelular (Favre et al., 2000).

Após 30 minutos da injeção de HI, quatro injeções de DNA na concentração de 50 µg/20 µL foram administradas, sendo duas em cada músculo. Logo após as injeções, foi realizada a eletroporação em ambos os músculos, aplicando-se uma voltagem de 375 V/cm em 3 pulsos com duração de 25 ms e intervalo de 0,5 s (Lima Filha, 2016). Foi utilizado o eletroporador ECM-830 e eletrodos do tipo paquímetro de 1,0 x 1,0 cm, não invasivos, utilizando uma distância de 3 mm entre as placas.

4.6 Bioensaios em camundongos *lit/scid*

Foi realizado um bioensaio de curta duração (7 dias) em camundongos *lit/scid* para comparar a eficiência do hGH-cDNA em relação ao hGH-gDNA, determinando-se os níveis de expressão de hGH e mIGF-1. Os animais foram divididos em quatro grupos, com 4 a 7 animais por grupo: o primeiro recebeu o plasmídeo hGH-gDNA; o segundo grupo recebeu o plasmídeo com o hGH-cDNA; o terceiro, o plasmídeo com o hGH-cDNA+3'; o quarto foi o do controle (camundongos *lit/scid* que receberam solução salina). Após 7 dias da

administração do DNA, o sangue dos camundongos foi retirado para dosar hGH e mIGF-1.

Um segundo bioensaio foi realizado com os mesmos grupos (n = 5 ou 6 animais/grupo), além de um grupo de camundongos heterozigotos sem tratamento (controle positivo de crescimento) para cálculo do *catch-up growth*. Esse segundo experimento teve duração de 30 dias, para avaliar se os níveis de expressão do hGH e do mIGF-1 se mantêm por um prazo maior, quando comparados ao experimento de curta duração, além de calcular o *catch-up growth* do comprimento total do corpo, da cauda, dos fêmures e do peso corporal. Os comprimentos totais do corpo e da cauda foram mensurados nos dias 0 e 30 por paquímetro digital. Os comprimentos dos fêmures foram mensurados nos dias -1 e 29 utilizando o equipamento *In Vivo Imaging System FX PRO*, disponível no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP), do Instituto de Ciências Biomédicas IV (USP/São Paulo); e o peso corpóreo foi determinado, em média, a cada três dias, iniciando no dia 1 até o dia 30, por balança digital.

4.7 Cálculo da porcentagem de recuperação de crescimento (*catch-up growth*)

O *catch-up growth* (CG), porcentagem de recuperação dos camundongos *lit/scid* quando comparados aos heterozigotos, foi calculado para os grupos que receberam as três diferentes variantes do plasmídeo contendo o hGH, utilizando a seguinte fórmula:

$$CG = (W_t - W_c) / (W_n - W_c) \times 100$$

Onde:

W_t = parâmetro analisado do grupo tratado com hGH;

W_c = parâmetro analisado do grupo controle (salina);

W_n = parâmetro analisado do grupo de animais heterozigotos, não tratados.

4.8 Determinação de hGH por ELISA e RP-HPLC

Após a obtenção do meio condicionado das células HEK-293 ou do plasma dos animais, a quantificação de hGH foi realizada, em duplicata, pelo sistema comercial específico *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA), com sensibilidade de 0,18 pg/mL. A quantificação das amostras foi realizada por espectrofotometria em absorbância a 450 nm.

A expressão de hGH por células HEK-293 também foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), de acordo com metodologia previamente padronizada por nosso grupo (Dalmora et al., 1997). Foi utilizado o HPLC SPD-20A acoplado a uma coluna C4 Grace Vydac 17/1 + Si60 18/1. Como preparação padrão foram utilizados 10 µg do r-hGH da Blau Farmacêutica S.A. (Cotia, SP, Brasil) e o volume das amostras desconhecidas (meios condicionados das células transfectadas com os 3 plasmídeos e controle negativo) foram definidos a partir da quantificação por ELISA (ver Resultados). A coluna foi equilibrada a 45 °C, com os tampões: A) 71,4% Tris 0,05M pH 7,5; B) 28,6% N-propanol. Foi utilizado um *loop* de 500 µL, o fluxo foi de 0,5 mL/min e a leitura da absorbância, a 220 nm.

4.9 Determinação de mIGF-1

O sangue coletado dos animais foi utilizado para determinar a concentração de mIGF-1 na circulação, utilizando o ELISA específico *Quantikine mouse-rat IGF-1 kit*, com sensibilidade de 8,4 pg/mL. As amostras foram analisadas em duplicata e a leitura foi realizada na absorbância a 450 nm.

4.10 Análise estatística

Os múltiplos grupos foram analisados utilizando o programa estatístico *Graphpad Prism* (versão 5.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), mediante análise de variância “two way ANOVA” e quando houve diferença significativa entre os grupos, esses foram comparados com o grupo controle utilizando o pós-teste de Bonferroni, considerando-se não significativo $P > 0,05$. Os dados foram apresentados como valores médios $\pm$ desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA

Após a reação de restrição dos vetores pUC-UBI-hGH-gDNA e pUC57-hGH-cDNA com as enzimas *Bam* *HI* e *Eco* *RI* e purificação do vetor pUC-UBI e do inserto hGH-cDNA, foi realizada uma primeira corrida eletroforética das amostras para confirmar a pureza dos fragmentos desejados (Figura 5). Seguiu-se então com a reação de ligação e transformação das bactérias competentes. A placa de Petri referente ao controle negativo não apresentou colônias, enquanto a placa semeada com as bactérias transformadas com o plasmídeo recém-construído apresentou mais de vinte colônias. Duas colônias da placa referente à construção foram inoculadas e seus plasmídeos extraídos. Uma segunda análise eletroforética foi, então, realizada para uma confirmação preliminar da construção (Figura 6).

Figura 5: Gel de agarose do pUC-UBI-hGH-gDNA e do pUC57-hGH-cDNA após digestão com *Bam* *HI* e *Eco* *RI*: 1) Ladder de 1 kb; 2) pUC-UBI-hGH-gDNA pré-purificado contendo as bandas referentes ao vetor e ao hGH-gDNA; 3) pUC-UBI (vetor) purificado; 4) pUC57-hGH-cDNA pré-purificação contendo as bandas referentes ao vetor e ao hGH-cDNA; 5) hGH-cDNA purificado.

Figura 6: Análise de restrição com as enzimas *Bam* *HI* e *Eco* *RI* para confirmar a construção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA. 1) Ladder de 1 kb; 2) Vetor (pUC-UBI) linearizado e purificado; 3) amostra da primeira colônia do plasmídeo recém-construído pUC-UBI-hGH-cDNA; 4) amostra da segunda colônia; 5) inserto hGH-cDNA purificado; 6) pUC-UBI-hGH-gDNA digerido 7) Plasmídeo pUC57-hGH-cDNA digerido.

Por último, foi realizado o sequenciamento de uma das amostras, e analisado pelo programa *BioEdit* alinhando o resultado com a sequência matriz NM_000515.4 (Figura 7). A correta construção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA foi então confirmada e essa amostra foi selecionada para utilização nos ensaios subsequentes.

Figura 7: Alinhamento da sequência molde do hGH-cDNA com os resultados do sequenciamento da construção do pUC-UBI-hGH-cDNA. A primeira linha representa a sequência molde; a segunda, o sequenciamento utilizando o *primer forward*; e a terceira, com o *primer reverse*.

5.2 Obtenção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA+3'

A segunda variante do plasmídeo contendo a sequência cDNA-hGH foi construída tendo como moldes os plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-gDNA, utilizando as enzimas de restrição *Xba I* e *Bgl II*. A enzima *Bgl II* restringe o último éxon do hGH, deixando assim a região *downstream* (3') do gene no plasmídeo (Figura 8).

Figura 8: Ilustração da construção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA+3'. Em 8A e 8B estão representadas, respectivamente, as regiões dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA e pUC-UBI-hGH-gDNA que contém os insertos do GH. As enzimas de restrição *Xba I* e *Bgl II* são utilizadas para separar o inserto do cDNA (8C) e o vetor linearizado pUC-UBI com um remanescente do éxon 5 e a região *downstream* 3' do GH (8D). Em 8E está representado o novo plasmídeo construído com o hGH-cDNA acrescido da região *downstream* 3' do GH.

Após a construção, uma análise de restrição foi realizada para confirmar a correta inserção do hGH-cDNA. Como a análise de restrição foi realizada com as enzimas *Bam* *HI* e *Eco* *RI*, ao invés das enzimas *Xba* *I* e *Bgl* *II*, a fim de padronizar a análise de insertos de hGH com esse primeiro par de enzimas, o inserto apresentou 1339 pb devido ao acréscimo da região *downstream* (3') (Figura 9). Por fim, o plasmídeo foi enviado ao CEGH-CEL para sequenciamento, e sua correta construção foi confirmada (Figura 10).

Figura 9: Análise de restrição para confirmar a construção do plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA+3'. 1) Ladder de 1 kb; 2) Plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA+3' recém construído. O inserto está com 786 pb (total de 1339 pb) a mais em relação ao inserto purificado na canaleta 4 devido à utilização da enzima *Eco* *RI*, a qual mantém a região 3' no inserto; 3) Vetor purificado; 4) inserto hGH-cDNA purificado (553 pb).

Figura 10: Alinhamento da sequência genômica do hGH com a sequência molde do hGH-cDNA e os resultados do sequenciamento da construção do pUC-UBI-hGH-cDNA+3'. A ordem das linhas é: 1ª Sequência genômica do hGH; 2ª Sequência complementar do hGH; 3ª *Primer forward* (com início dentro do gene do hGH); 4ª *Primer forward* (com início no plasmídeo, anterior ao sítio de clonagem do hGH); 5ª *Primer reverse* (com início dentro do gene do hGH); e 6ª *Primer reverse* (com início no plasmídeo, depois do sítio de clonagem do hGH).

5.3 Confirmação da obtenção dos plasmídeos em sua forma pura

Bactérias *E. coli* DH5 α contendo os plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA ou pUC-UBI-hGH-cDNA+3' foram inoculadas em meio LB com 1% de ampicilina a 37 °C e 180 rpm *overnight*. Os plasmídeos foram purificados dos inóculos por meio de kit comercial e uma análise de restrição foi realizada, utilizando as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI, para confirmar sua identidade e pureza (Figura 11). Foi também feita a quantificação dos mesmos e confirmação da pureza mediante leitura espectrofométrica, antes de sua utilização nos ensaios subsequentes.

Figura 11: Análise de restrição com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI para confirmar a correta amplificação dos plasmídeos para utilização em ensaios posteriores. 1) Ladder de 1 kb; 2) Plasmídeo pUC-UBI e inserto hGH-gDNA de 2152 pb; 3) Vetor pUC-UBI e inserto hGH-cDNA de 832 pb; 4) Vetor pUC-UBI e inserto hGH-cDNA+3' de 1339 pb.

5.4 Expressão de hGH *in vitro* por células HEK-293

Foi realizada a transfecção de células HEK-293 para determinar os níveis de expressão de hGH *in vitro* pelos plasmídeos contendo as sequências do gDNA, cDNA ou cDNA+3' desse hormônio. Células HEK-293 aderentes foram cultivadas em garrafas para cultura celular e, posteriormente, foram transferidas para placas de 6 poços (1.10^6 células/poço), um dia antes do início do ensaio (Figura 12). Após 48 horas, o meio foi coletado e os níveis de hGH expressos foram quantificados por um sistema comercial ELISA, em duplicata (Tabela 1 e Figura 13). Pelo teste ANOVA foi demonstrada diferença estatística entre os grupos ($P < 0,0001$), enquanto que no pós-teste houve diferença estatística apenas entre o grupo de gDNA e os grupos de cDNA e controle ($P < 0,0002$), sendo que não houve diferença estatística entre os grupo de cDNA/cDNA+3' e entre esses grupos e o controle.

Figura 12: Células HEK-293 aderentes dois dias antes da transfecção.

Tabela 1: Níveis de expressão *in vitro* de hGH determinados no meio condicionado de células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle.

Grupo	hGH ($\mu\text{g/mL}$)
gDNA	$20,96 \pm 4,28$
cDNA	$1,59 \pm 0,42$
cDNA+3'	$3,13 \pm 0,71$
Controle	Não detectável

Figura 13: Níveis de expressão de hGH no meio condicionado após 48 h da transfecção de células HEK-293 com os plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle. Níveis de significância calculados em comparação ao grupo controle (* P < 0,0002).

5.5 Análise dos níveis de expressão de hGH por RP-HPLC

As células transfectadas foram mantidas, após a primeira coleta, em meio RPMI sem SFB por mais 48 horas, para determinação do tempo de retenção e da quantidade do hGH produzido pelos diferentes plasmídeos, mediante cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), como apresentado na Figura 14. Como a determinação por ELISA havia mostrado que o grupo transfectado com o plasmídeo contendo a sequência gDNA do hGH apresentou uma maior expressão, as quantidades em volume dos meios condicionados, oriundas das diferentes transfecções e utilizadas na RP-HPLC, foram calculadas com base nessa determinação imunológica e estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2: Volume dos meios condicionados, oriundos das células HEK-293 transfectadas com os diferentes plasmídeos, que foram utilizados para a quantificação do hGH expresso por RP-HPLC.

Meio condicionado	Volume (mL)
gDNA	0,5
cDNA	6
cDNA+3'	3
Controle negativo	6

Figura 14: Cromatograma mostrando a expressão de hGH em RP-HPLC: r-hGH comercial (Blau Farmacêutica S.A., 20 µL/10 µg) (marrom); hGH-gDNA (preto); hGH-cDNA (vermelho), hGH-cDNA+3' (azul); controle negativo (verde). No caso dos plasmídeos e do controle negativo foram usados os meios condicionados derivados das células HEK-293 transfectadas.

É possível observar que os grupos gDNA, cDNA e cDNA+3' apresentaram picos no tempo de retenção de aproximadamente 22,9 min, enquanto o hGH comercial em 21,8 min e o controle negativo não apresentou pico.

As áreas dos picos e suas respectivas quantificações, usando como base o hGH comercial, estão indicadas na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação do hGH expresso nos meios condicionados de células HEK-293 transfectadas com os diferentes vetores de expressão e controle negativo, analisados em RP-HPLC.

Preparação	Área do pico (UA)	Quantificação*
hGH comercial	6308696	10 µg
gDNA	3545264	11,24 µg/mL
cDNA	1121521	0,3 µg/mL
cDNA+3'	1475144	0,78 µg/mL
Controle negativo	0	0

*As concentrações de hGH expresso nos meios condicionados foram calculadas com base na quantidade utilizada do hGH comercial, relacionando a área do pico em UA (unidades de área) desta preparação a de cada uma das demais preparações.

Apesar dos níveis de expressão de hGH determinados pelo ELISA e a RP-HPLC não coincidirem, visto que são de coletas de dias e meios de cultura diferentes, ainda assim é possível verificar que houve uma correlação desses níveis pelos dois métodos de quantificação, baseados em princípios de detecção completamente diversos.

5.6 Genotipagem de camundongos para bioensaio

Camundongos nascidos do cruzamento entre machos homozigotos para a mutação *little* (*lit/lit*) e fêmeas heterozigotas (*lit/+*) para o mesmo gene, foram genotipados para a confirmação da mutação, e apenas aqueles homozigotos *little*

foram utilizados nos bioensaios. O PCR das amostras gera um fragmento de 158 pb, e como a enzima de restrição BseG I cliva alelos não mutados, bandas de 135 pb representam os alelos não mutados do camundongo normal (+/+), enquanto que aquelas de 158 pb não foram clivadas devido à mutação, caracterizando o fenótipo anão (*lit/lit*); e o camundongo heterozigoto (*lit/+*) apresenta as duas bandas: de 135 e 158 pb (Figura 15).

Figura 15: Gel de agarose para confirmar a mutação *little* nos camundongos. 1) Ladder de 100 pb; 2 ao 7) Amostras de camundongos. 4, 7 e 8 são exemplos de amostras de camundongos homozigotos para a mutação *little* (*lit/lit*); 5 e 6 são amostras de camundongos heterozigotos (*lit/+*).

5.7 Bioensaio de curta duração (7 dias) em camundongos *lit/scid*

Um bioensaio de curta duração (7 dias) foi realizado com o objetivo de verificar os níveis de expressão de hGH e de mIGF-1 nos camundongos *lit/scid* a curto prazo. Os grupos foram gDNA, cDNA, cDNA+3' e controle (n = 4-7), sendo que esse último recebeu apenas solução salina. Após 7 dias da eletroporação, o sangue dos camundongos foi coletado e utilizado para determinar os níveis de hGH (Tabela 6 e Figura 16) e mIGF-1 (Tabela 7 e Figura 17) expressos por ELISA, em duplicata. Para a expressão de hGH, houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,039$) pelo teste ANOVA, enquanto que pelo pós-teste de Bonferroni foi observada diferença significativa entre os grupos DNA e controle ($P < 0,0001$), e os grupos gDNA/cDNA+3' ($P = 0,0262$); enquanto para a expressão de mIGF-1, utilizando o teste ANOVA foi demonstrada diferença entre os grupos ($P = 0,0011$), e pelo pós-teste foi obtida significância entre os grupos controle/gDNA ($P = 0,001$), controle/cDNA+3' ($P = 0,0277$), gDNA/cDNA ($P = 0,0168$); não havendo diferença estatística entre os grupos controle/cDNA, cDNA/cDNA+3' e gDNA/cDNA+3'.

Os resultados desse primeiro ensaio *in vivo* mostraram, portanto, que o plasmídeo contendo a sequência do gDNA do hGH, assim como no ensaio *in vitro*, expressa níveis mais altos do hormônio.

Tabela 6: Níveis de expressão de hGH em camundongos *lit/scid* após 7 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA ou controle.

Grupo	n	hGH (pg/mL)
gDNA	4	947,30 ± 194,95
cDNA	5	785,91 ± 201,38
cDNA+3'	7	666,0 ± 165,35
Controle	6	indetectável

Tabela 7: Níveis de expressão de mIGF-1 em camundongos *lit/scid* após 7 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA ou controle.

Grupo	n	mIGF-1 (ng/mL)
gDNA	4	81,31 ± 11,92
cDNA	5	45,31 ± 17,10
cDNA+3'	7	55,48 ± 17,35
Controle	2	14,36 ± 2,14

Figura 16: Níveis de expressão de hGH em camundongos *lit/scid* após 7 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle. Níveis de significância calculados em comparação ao grupo controle e cDNA+3' (** P < 0,027) ou controle apenas (* P < 0,0001).

Figura 17: Níveis de expressão de mIGF-1 em camundongos *lit/scid* após 7 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle. Níveis de significância calculados em comparação ao grupo controle e cDNA (** P < 0,017) ou controle apenas (* P < 0,028).

5.8 Bioensaio de longa duração (30 dias) em camundongos *lit/scid*

Foi também realizado um bioensaio com maior duração (30 dias), a fim de verificar como são mantidos os níveis de expressão de hGH e mIGF-1, além de determinar a variação do peso corporal, do comprimento total do corpo, da cauda e dos fêmures, e calcular o *catch-up growth* desses parâmetros. Os grupos foram divididos em gDNA, cDNA, cDNA+3', controle (camundongos injetados com solução salina) e normal (camundongos *scid* sem mutação para o GHRHR) (n = 5 ou 6/grupo).

5.8.1 Níveis de expressão de hGH e mIGF-1 ao final do bioensaio de 30 dias

Na Tabela 8 e Figura 18 são encontrados os valores de hGH, e na Tabela 9 e Figura 19, os de mIGF-1, obtidos ao final de 30 dias de tratamento. Pelo teste ANOVA houve diferença estatística para os níveis de expressão de hGH após 30 dias da administração ($P < 0,0001$), enquanto mediante o pós-teste de Bonferroni foi observada diferença estatística apenas dos grupos tratados com DNA em relação ao controle ($P < 0,0001$), não havendo diferença entre os grupos tratados com as variantes do hGH. Em relação aos níveis de mIGF-1, pelo teste ANOVA foi também demonstrada diferença entre os grupos ($P < 0,0001$), enquanto utilizando o pós-teste foram obtidas diferenças entre quase todos os grupos: controle/gDNA ($P = 0,0006$), controle/cDNA+3' ($P = 0,0003$), gDNA/cDNA ($P = 0,0428$), cDNA/cDNA+3' ($P = 0,0183$), e normal em relação a todos os outros grupos ($P < 0,0001$), não havendo diferença entre os grupos gDNA/cDNA+3' e cDNA/controle. Esses resultados mostraram que os níveis de hGH se igualaram ao final do experimento nos 3 grupos de DNA, enquanto que o gDNA e o cDNA+3' foram capazes de manter níveis mais elevados de mIGF-1 durante o tratamento.

Tabela 8: Níveis de expressão de hGH em camundongos *lit/scid* após 30 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle, e em camundongos normais.

Grupo	n	hGH (ng/mL)
gDNA	6	3,17 ± 0,87
cDNA	6	3,34 ± 0,80
cDNA+3'	5	3,80 ± 0,60
Controle	6	indetectável

Figura 18: Níveis de expressão de hGH em camundongos *lit/scid* após 30 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle, e em camundongos normais. Níveis de significância calculados em comparação ao grupo controle (* $P < 0,0001$).

Tabela 9: Níveis de expressão de mIGF-1 em camundongos *lit/scid* após 30 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle, e em camundongos normais.

Grupo	n	mIGF-1 (ng/mL)
gDNA	6	118,25 ± 44,10
cDNA	6	49,21 ± 16,02
cDNA+3'	6	125,85 ± 42,58
Controle	5	6,54 ± 1,06
Normal	6	426,83 ± 53,65

Figura 19: Níveis de expressão de mIGF-1 em camundongos *lit/scid* após 30 dias da administração dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3' ou controle, e em camundongos normais. Níveis de significância calculados em comparação aos grupos cDNA e controle (* $P < 0,043$), ou a todos os outros grupos (** $P < 0,0001$).

5.8.2 Variação do peso corpóreo dos camundongos

O peso corpóreo dos camundongos foi determinado em balança digital com intervalos de aproximadamente 3 dias, desde o início do experimento (dia 0), até o dia do término (dia 30) para cálculo da variação de peso (Figura 20).

Pelo teste ANOVA foi verificado que houve diferença estatística para o último dia de experimento ($P < 0,0001$), enquanto utilizando o pós-teste de Bonferroni foram obtidas diferenças entre os grupos controle/gDNA ($P < 0,0001$), controle/cDNA+3' ($P = 0,0008$), gDNA/cDNA ($P = 0,0021$), gDNA/normal ($P = 0,0175$), não havendo diferença entre gDNA/cDNA+3', cDNA/normal, cDNA/cDNA+3', cDNA/controle e cDNA+3'/normal, controle/normal. As equações das curvas de crescimento foram as seguintes:

- gDNA: $Y = - 0,2439 + 0,3056 X - 0,005849 X^2$ ($R^2 = 0,9923$)
- cDNA: $Y = - 0,4453 + 0,1452 X - 0,002275 X^2$ ($R^2 = 0,9366$)
- cDNA+3': $Y = - 0,4053 + 0,2262 X - 0,003971 X^2$ ($R^2 = 0,9818$)
- Controle: $Y = - 0,08387 + 0,09217 X - 0,001781 X^2$ ($R^2 = 0,9503$)
- Normal: $Y = - 0,2237 + 0,1595 X - 0,002316 X^2$ ($R^2 = 0,9814$).

Ajustando as equações das curvas usando a função quadrática, os valores das inclinações foram de 0,3056 (gDNA), 0,1452 (cDNA), 0,2262 (cDNA+3'), 0,09217 (controle) e 0,1595 (normal) em g/camundongo/dia. Esses resultados mostraram que o gDNA do hGH apresentou um maior incremento de peso em ensaio *in vivo* com camundongos *lit/scid*.

Figura 20: Incremento de peso de camundongos *lit/scid* tratados com pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3', solução salina (Controle) e de camundongos normais sem a mutação para o gene GHRHR (Normal). Peso determinado, em média, a cada três dias, desde o início do experimento (dia 0) até o final (dia 30).

5.8.3 Variação do comprimento total do corpo

O comprimento total do corpo dos camundongos foi mensurado com paquímetro digital no início (dia 0) e no final (dia 30) do experimento (Figura 21). Pelo teste ANOVA foi demonstrada diferença estatística entre os grupos ($P < 0,0001$), enquanto mediante uso do pós-teste foram obtidas diferenças entre os grupos controle/gDNA ($P < 0,0001$), controle/cDNA+3' ($P = 0,0023$), controle/normal ($P = 0,0159$), gDNA/cDNA ($P = 0,0004$), gDNA/cDNA+3' ($P = 0,0224$), gDNA/normal ($P = 0,0036$), não havendo diferença estatística entre os grupos cDNA/cDNA+3', cDNA/normal, cDNA/controle, cDNA+3'/normal.

Figura 21: Variação do comprimento total do corpo dos camundongos *lit/scid* tratados com pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3', solução salina (controle) e de camundongos normais (sem mutação para o gene GHRHR). O comprimento foi mensurado no início do experimento (dia 0) e no final (dia 30). Níveis de significância calculados em comparação a todos os grupos (* $P < 0,023$), ou apenas ao grupo controle (** $P < 0,024$).

5.8.4 Variação do comprimento da cauda

As caudas foram mensuradas com paquímetro digital no início (dia 0) e final do experimento (dia 30) para calcular a variação de comprimento entre os grupos (Figura 22). Pelo teste ANOVA foi verificada significância estatística entre os grupos ($P < 0,0001$), enquanto com a aplicação do pós-teste foram obtidas diferenças estatísticas entre os grupos controle/gDNA ($P < 0,0001$), controle/cDNA+3' ($P = 0,0002$), gDNA/cDNA ($P < 0,0001$), gDNA/cDNA+3' ($P = 0,0162$), gDNA/normal ($P < 0,0001$), cDNA/cDNA+3' ($P = 0,0011$) e cDNA+3'/normal ($P = 0,0105$), não havendo diferenças estatísticas entre os grupos controle/cDNA, cDNA/normal e controle/normal.

Figura 22: Variação do comprimento da cauda dos camundongos *lit/scid* tratados com pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3', solução salina (controle) e de camundongos normais (sem mutação para o gene GHRHR). O comprimento foi mensurado no início do experimento (dia 0) e no final (dia 30). Níveis de significância calculados em comparação a todos os grupos (* $P < 0,017$).

5.8.5 Variação do comprimento dos fêmures

Os fêmures dos grupos de camundongos foram mensurados por radiografia um dia antes do início do experimento (- 1) e no final do experimento (dia 30) para cálculo da variação do comprimento (Figura 23). Pela utilização do teste ANOVA foi verificado não haver diferença entre os grupos quando comparados os fêmures direito, esquerdo ou ambos.

Figura 23: Variação do comprimento dos fêmures dos camundongos *lit/scid* tratados com pUC-UBI-hGH-gDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA, pUC-UBI-hGH-cDNA+3', solução salina (controle) e de camundongos normais (sem mutação para o gene GHRHR). O comprimento foi mensurado um dia antes do início do experimento (dia - 1) e no final (dia 30). Nesta figura foram usadas as médias das variações entre os comprimentos dos fêmures direitos e esquerdos de cada animal. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).

5.8.6 Cálculo do *catch-up growth*

Foram calculadas as porcentagens de *catch-up growth* de todos os parâmetros de crescimento analisados nos camundongos tratados com os diferentes vetores de expressão de hGH, e os valores se encontram na Tabela 10, na qual também podemos observar as medidas iniciais e finais, os respectivos incrementos e os níveis de significância, incluindo os valores dos grupos controle e normal. As porcentagens variaram de 1,2 até mais de 32%, dependendo do parâmetro e do plasmídeo analisado, sendo que o plasmídeo contendo a sequência do gDNA do hGH apresentou os maiores valores para todos os parâmetros analisados.

Tabela 10: Parâmetros de crescimento analisados nos camundongos *lit/scid* tratados com os diferentes plasmídeos de hGH ou solução salina, para camundongos do grupo controle, e em camundongos normais, no bioensaio de 30 dias, incluindo o cálculo do *catch-up growth*.

Parâmetro de crescimento	Antes do tratamento	Final do Tratamento	Incremento (%)	Significância	Catch-up (%)
Peso corpóreo (g)					
Controle	8,09 ± 0,49	9,1 ± 0,53	12,48	0,0067	
gDNA	7,13 ± 0,65	10,81 ± 0,58	51,61	< 0,0001	20,5
cDNA	7,63 ± 1,91	9,2 ± 1,2	20,57	0,0474	1,2
cDNA+3'	7,64 ± 1,15	10,3 ± 1,8	34,81	0,0124	14,4
Normal	15,2 ± 1,97	17,43 ± 2,02	14,67	n.s.*	
Comprimento da cauda (cm)					
Controle	6,1 ± 0,12	6,3 ± 0,1	4,01	0,0052	
gDNA	5,9 ± 0,3	6,7 ± 0,3	13,94	0,0006	20,8
cDNA	6,1 ± 0,2	6,4 ± 0,2	4,75	n.s.	2,7
cDNA+3'	6,1 ± 0,2	6,7 ± 0,3	10,42	0,0012	21,8
Normal	7,7 ± 0,3	8,0 ± 0,3	4,63	n.s.	
Comprimento total do corpo (cm)					
Controle	12,1 ± 0,2	12,4 ± 0,2	2,21	0,0241	
gDNA	11,6 ± 0,4	13 ± 0,8	11,51	0,004	16,6
cDNA	12 ± 0,4	12,6 ± 0,5	5,01	0,0388	5,1
cDNA+3'	11,9 ± 0,5	13 ± 0,8	8,56	0,0229	16,7
Normal	15 ± 0,6	15,9 ± 0,7	5,93	0,028	

Comprimento do fêmur direito (mm)					
Controle	7,79 ± 0,64	8,16 ± 0,33	4,74	n.s.	
gDNA	7,67 ± 0,44	8,63 ± 0,31	12,51	0,0016	27,6
cDNA	7,02 ± 0,49	7,4 ± 0,57	5,41	n.s.	0
cDNA+3'	7,79 ± 0,16	8,39 ± 0,67	7,7	n.s.	13,5
Normal	9,48 ± 0,36	9,86 ± 0,37	4	n.s.	
Comprimento do fêmur esquerdo (mm)					
Controle	7,62 ± 0,45	8,29 ± 0,31	8,79	0,0319	
gDNA	7,97 ± 0,39	8,98 ± 0,54	12,67	0,0022	32,4
cDNA	7,8 ± 0,55	7,79 ± 0,62	0	n.s.	0
cDNA+3'	7,81 ± 0,19	8,53 ± 0,38	9,21	0,0086	14,1
Normal	9,82 ± 0,52	10,42 ± 0,54	6,1	0,0444	
Média do comprimento dos fêmures direito e esquerdo (mm)					
Controle	7,71 ± 0,53	8,22 ± 0,31	6,61	n.s.	
gDNA	7,82 ± 0,42	8,80 ± 0,45	12,53	< 0,0001	30,2
cDNA	7,41 ± 0,64	7,59 ± 0,60	2,42	n.s.	0
cDNA+3'	7,80 ± 0,17	8,44 ± 0,57	8,2	0,0021	11,5
Normal	9,65 ± 0,46	10,14 ± 0,53	5,07	0,0109	

*n.s. = não significativo (P > 0,05).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi proposta a construção de duas variantes do plasmídeo pUC-UBI-hGH, que contém a sequência genômica (gDNA) do hGH e que já foi utilizado pelo nosso grupo de terapia gênica (Oliveira et al., 2010; Cecchi et al., 2014, Higuti et al, 2012 e 2016). O objetivo principal do presente projeto foi comparar os níveis de expressão de hGH e mIGF-1, além de determinar parâmetros de crescimento (peso corpóreo, comprimento total do corpo, da cauda e dos fêmures) e calcular o *catch-up growth* de camundongos *lit/scid* injetados com esses plasmídeos, seguido de eletrotransferência, de acordo com metodologia padronizada em trabalhos anteriores (Oliveira et al., 2010; Cecchi et al., 2014, Higuti et al, 2012 e 2016, Lima Filha, 2016). Essas duas variantes, uma contendo a sequência cDNA do hGH, enquanto a segunda, o cDNA acrescido da região *downstream* (3') do gDNA, foram utilizadas devido a uma indicação preliminar (Oliveira, 2010), de que a sequência do cDNA do hGH poderia apresentar maiores níveis de expressão no nosso modelo de terapia gênica; e a partir de relatos da literatura de que o acréscimo da região 3' do gDNA poderia aumentar os níveis de expressão do GH, uma vez que essa região é conhecida por conter sequências que podem melhorar a eficiência de transcrição (Proudfoot, 2011 e 2016; Hunter et al., 2019).

Após a construção dos novos plasmídeos, seguindo técnicas clássicas de Biologia Molecular, foi realizada a transfecção de células HEK293 para determinar os níveis de expressão de hGH *in vitro*. Os três vetores apresentaram níveis de expressão de hGH recombinante, sendo que a expressão daquele contendo o gDNA foi de aproximadamente 7-13 vezes maior do que as obtidas com o cDNA e cDNA+3'. Devido ao alto nível de expressão do plasmídeo contendo a sequência gDNA do hGH quando comparado aos demais grupos, a relevância estatística se deu ao comparar apenas esse plasmídeo aos demais, não havendo diferença estatística entre os grupos de cDNA e controle.

A determinação dos níveis de expressão foi também realizada utilizando uma metodologia de RP-HPLC, padronizada em nosso laboratório (Dalmora et al., 1997). O hGH secretado, nos meios condicionados das células transfectadas com os diferentes plasmídeos (gDNA, cDNA e cDNA+3'), apresentou tempos de retenção de aproximadamente 23 minutos, enquanto que a preparação de r-hGH utilizada como padrão apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 22 minutos. Apesar desta pequena diferença entre os tempos de retenção, foi possível realizar um cálculo de quantificação do hGH expresso pelos diferentes plasmídeos e verificou-se que houve uma correlação entre as duas técnicas: ELISA e RP-HPLC.

Yamashita et al. (1990) compararam os níveis de expressão *in vitro* do gene da linfotoxina humana (hLT) em células CHO. Quatro plasmídeos foram construídos para o experimento, todos sob regulação do promotor SV40, sendo dois contendo o gDNA-hLT e dois contendo o cDNA-hLT. Em cada grupo, um plasmídeo continha o íntron SV40 e o sinal de poli A, enquanto o outro não continha nenhum dos dois. Assim como em nosso estudo, o plasmídeo contendo apenas a sequência do gDNA apresentou os maiores níveis de expressão, seguido pelas construções acrescidas do íntron SV40 na região 3' e da poli A, sendo que aquele contendo apenas o cDNA não apresentou níveis significativos de expressão. Uma das hipóteses citadas pelos autores para o fato do plasmídeo contendo apenas gDNA apresentar os maiores níveis de expressão é a possível importância dos íntrons no *splicing* do gene da hLT e na estabilidade do mRNA.

Em outro estudo, o gene da insulina humana foi transfectado em células COS, para verificar os níveis de expressão desta proteína a partir de plasmídeos com promotor SV40, 136 nucleotídeos na região 3' e sequência poli A. Os plasmídeos continham o gDNA, cDNA ou gDNA acrescido de *enhancers* de SV40 (Laub et al, 1983). Nesse experimento, verificou-se que não houve diferença estatística na transcrição dos genes contendo as sequências gDNA e cDNA da insulina humana. Por outro lado, os resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Yamashita no que diz respeito a não haver diferença entre gDNA e cDNA acrescidos de íntron e poli A.

Na literatura, a região 3' do hGH e sua poli A são conhecidas por aumentar os níveis de expressão de proteínas recombinantes *in vitro*, pois podem melhorar o transporte do mRNA para o citoplasma, sua estabilidade e eficiência de tradução (Hunter et al, 2019). De fato, quando comparados os níveis de expressão do cDNA e cDNA+3', esse último apresentou os melhores resultados, porém não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) nos experimentos *in vitro* e *in vivo* (bioensaio de 7 dias), sendo que a sequência do gDNA, que em relação ao cDNA+3' possui apenas os íntrons a mais, mostrou níveis de expressão quase dez vezes mais altos, o que pode indicar que os íntrons do hGH desempenham um importante papel na expressão dessa proteína, possivelmente melhorando a estabilidade do mRNA.

Após o ensaio *in vitro*, foram realizados dois ensaios *in vivo* para determinar os níveis de expressão do hGH e mIGF-1 pelas diferentes variantes do plasmídeo e como esses influenciam o crescimento de camundongos *lit/scid*.

O primeiro ensaio *in vivo* foi realizado para determinar os níveis de expressão de hGH pelas diferentes variantes do nosso plasmídeo e quanto esses estimulam a expressão de mIGF-1 a curto prazo (7 dias). Diferentemente do ensaio *in vitro*, este primeiro ensaio *in vivo* mostrou que houve diferença estatística apenas entre os grupos de DNA/controle e gDNA/cDNA+3'. Assim como no ensaio *in vitro*, o plasmídeo contendo a sequência gDNA apresentou os maiores níveis de expressão de hGH, apesar de não ter sido obtido o mesmo padrão de expressão do ensaio *in vitro* de mais de dez vezes, quando comparado aos grupos de cDNA.

Comparando os níveis de mIGF-1, o grupo injetado com o plasmídeo contendo o gDNA apresentou o melhor resultado, seguido pelos grupos cDNA+3', cDNA e controle. Esses resultados mostraram um padrão interessante: apesar do cDNA expressar mais hGH do que o cDNA+3', esse último expressou mais mIGF-1. O mIGF-1 tem sua expressão majoritariamente devido ao estímulo do GH, então os níveis de mIGF-1 deveriam ser proporcionais aos níveis desse hormônio, o que pode indicar que a construção contendo apenas o cDNA expressa moléculas de GH que não são tão eficientes ao estimular a síntese do IGF-1 como

àquela contendo a sequência gDNA. Esse fato pode ser a diversos fatores, como, por exemplo, a eficiência na síntese de mRNA e sua estabilidade sejam diferentes para os três vetores analisados. Como o vetor contendo a sequência do gDNA demonstrou os melhores resultados na expressão de GH nos ensaios *in vivo* de curta duração e, principalmente, no *in vitro*, é possível que o mRNA sintetizado a partir desse plasmídeo seja mais estável e mais eficiente para a tradução, ou até mesmo que seja sintetizado em maior quantidade quando comparado aos demais grupos.

Um segundo bioensaio *in vivo* foi realizado para analisar os níveis de expressão de hGH e mIGF-1 a um prazo maior, além de comparar o incremento dos parâmetros de crescimento entre os grupos. Nesse segundo ensaio, não houve diferença estatística para a expressão de hGH entre os grupos que receberam as diferentes variantes do plasmídeo, ao final do tratamento de 30 dias. O mais interessante desse experimento foi o padrão de expressão do mIGF-1, que confirmou o do bioensaio de 7 dias, com o gDNA e cDNA+3' apresentando os maiores níveis de expressão. Esse resultado está de acordo com o experimento de curta duração, o que reforça a teoria do plasmídeo contendo o cDNA ser menos eficiente para o estímulo de mIGF-1, quando comparado aos outros dois.

Analisando os níveis totais de expressão de hGH e mIGF-1 dos experimentos de curta e longa duração, percebemos que os valores de expressão foram maiores no experimento de longa duração. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores do grupo (Oliveira et al., 2010, Cecchi et al., 2014), que utilizaram o plasmídeo pUC-UBI-hGH-gDNA e determinaram os níveis de expressão de hGH e mIGF-1 em diferentes tempos ao longo dos experimentos.

Ainda no experimento de longa duração, foram coletados dados para cálculos de incremento de crescimento, a fim de verificar se existem diferenças no estímulo entre os grupos.

Para todos os parâmetros avaliados (variação do peso, do comprimento total do corpo, da cauda e dos fêmures), o grupo de animais injetados com o gDNA do hGH apresentou os melhores resultados de incremento, seguido pelos grupos cDNA+3' e cDNA. Esses resultados estão de acordo com o esperado pelos

níveis de expressão de mIGF-1, uma vez que o IGF-1 atua diretamente nos tecidos, promovendo o crescimento; e também corroboram a teoria de que os diferentes plasmídeos produzem diferentes moléculas de hGH, cada uma apresentando diferentes níveis de estímulo do IGF-1, e, por consequência, diferença nos níveis de *catch-up growth*, o que poderia ser devido a diferença na estabilidade de mRNA sintetizado pelos diferentes plasmídeos e seus níveis de tradução.

Apenas as curvas de variação de peso dos grupos tratados com gDNA e cDNA+3' apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. Após o ajuste das equações das curvas usando a função quadrática, os valores das inclinações das mesmas foram de 0,3056 (gDNA), 0,1452 (cDNA), 0,2262 (cDNA+3'), 0,09217 (controle) e 0,1595 (normal) em g/camundongo/dia. Comparando esses resultados com os experimentos de Lima Filha (2016), que padronizou os parâmetros para o nosso modelo de terapia gênica, encontramos padrões semelhantes, de 0,2256 para o grupo tratado e 0,1195 para o grupo de animais heterozigotos em g/camundongo/dia. É necessário lembrar que os experimentos de Lima Filha foram realizados em camundongos *lit/lit* utilizando o vetor plasmidial pUC-UBI-mGH-gDNA.

Por fim, os níveis de *catch-up growth* foram calculados. Os melhores resultados foram obtidos pelo grupo gDNA, alcançando níveis de 16 ~ 30%, dependendo do parâmetro avaliado. Higuti et al. (2016) também utilizaram o plasmídeo contendo a sequência hGH-gDNA em camundongos *lit/scid*, alcançando resultados de 35,5 a 76% de *catch-up growth*. A maior diferença entre os resultados foi para o *catch-up growth* dos fêmures, onde o presente trabalho alcançou pouco mais de 30%, enquanto que Higuti et al.(2016) obteve mais de 75%. É necessário ressaltar que o experimento de Higuti e colaboradores teve duração de 60 dias e contou com uma segunda administração do plasmídeo, enquanto que o experimento desse trabalho durou apenas 30 dias e apenas uma administração plasmidial foi realizada. É bem provável que os valores maiores de *catch-up growth* em relação ao presente experimento sejam devido ao fato da duração total do experimento e ao número de injeções terem sido maiores, uma

vez que um tempo maior de exposição dos camundongos ao hormônio e a um número maior de moléculas do plasmídeo resultam em maiores incrementos de crescimento.

No trabalho de Lima Filha (2016) também foram realizados cálculos de *catch-up growth*. Os resultados encontrados foram de 40 a 80%, dependendo do parâmetro. Sendo que, mais uma vez, o *catch-up growth* dos fêmures foi o que apresentou as maiores porcentagens, ao redor de 80%. Uma possível explicação para o ocorrido é o fato de que os experimentos de Lima Filha terem utilizado camundongos *lit/lit* e o plasmídeo contendo a sequência do mGH-gDNA. Como já observado por Cecchi et al. (2014) em outro modelo animal, há diferença no *catch-up growth* de grupos tratados com plasmídeos contendo mGH e hGH. Esse efeito pode ser em parte devido à resposta imune observada quando administrado hGH em camundongos *lit*.

Os resultados alcançados nesse trabalho vão de encontro daqueles obtidos por Oliveira (2010), onde os níveis de expressão de hGH em camundongos *lit/scid* injetados com plasmídeo contendo a sequência cDNA demonstraram os melhores resultados. O fato dos resultados do presente trabalho estarem em discordância com os de Oliveira (2010) pode ser devido aos vetores plasmidiais utilizados serem diferentes, além do promotor desse trabalho ser o UBI, enquanto o promotor utilizado por Oliveira (2010) foi o CMV. Estudos futuros poderão esclarecer se há diferença na proporção dos níveis de GH em plasmídeos contendo o gDNA em relação ao cDNA regulados por UBI ou CMV em um mesmo vetor plasmidial.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Quanto à secreção do hGH *in vitro*, o plasmídeo contendo a sequência do gDNA apresentou níveis de expressão da ordem de dez vezes maiores em relação àqueles que possuem as sequências do cDNA;
- ✓ A incorporação da região *downstream* do hGH proporcionou um aumento dos níveis de expressão *in vitro* quando comparado à sequência do cDNA, apesar desses não atingirem os níveis obtidos pelo plasmídeo com o gDNA;
- ✓ Quanto à expressão *in vivo* do hGH no nosso modelo de terapia gênica, não houve diferença entre os plasmídeos contendo as sequências gDNA, cDNA e cDNA+3';
- ✓ Apesar dos plasmídeos com as diferentes sequências do GH (gDNA, cDNA e cDNA+3') sintetizarem níveis similares do hormônio no nosso modelo de terapia gênica, cada plasmídeo induziu níveis diferentes de mIGF-1 (sendo o gDNA o grupo que mais expressou mIGF-1), o que resultou em diferenças na melhora fenotípica e *catch-up growth*;
- ✓ Os íntrons parecem ter desempenhado um papel importante na expressão do hGH e sua capacidade de estimular a síntese de mIGF-1, corroborando para que continuemos a utilizar o plasmídeo com o gDNA do hGH em estudos futuros de terapia gênica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA, M.; FINTINI, D.; SALVATORI, R. Effects of recombinant mouse growth hormone treatment on growth and body composition in ghrh knock out mice. **Growth Horm. IGF Res.** v. 15, p. 275-282, 2005.
- BELLINI, M.H.; PERONI, C.N.; BARTOLINI, P. Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (*lit/scid*) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes. **FASEB J.** v. 17, p. 2322-2324, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 28, de 30 de Novembro de 2018. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Deficiência do Hormônio de Crescimento – Hipopituitarismo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2018. Seção 1, p. 55.
- CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; LIMA, E. R.; VIEIRA, D. P.; SQUAIR, P. L.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P. Efficient non-invasive plasmid-DNA administration into tibialis cranialis muscle of “*little*” mice. **Curr. Mol. Med.** v. 20. p 230-235, 2017.
- CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, N.A.J.; LIMA, E. R.; JACOBSEN M.; DAGNAES-HANSEN, F.; AAGARD, L.; JENSEN, T.G.; JORGE, A.A.L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C.N. A novel homologous model for gene therapy of dwarfism by non-viral transfer of mouse growth hormone gene into immunocompetent dwarf mice. **Curr. Gene Ther.** v. 14. p. 44-51, 2014.
- CERVIA, L. D.; YUAN, F. Current progress in electrotransfection as a nonviral method for gene delivery. **Mol. Pharm.** v. 15, p. 3617-3624, 2018.

CLEMMONS, D. R.; Metabolic actions of IGF-1 in normal physiology and diabetes. ***Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*** V. 41 (2), p. 425-423, 2012.

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

DALMORA, S.; OLIVEIRA, J, E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M, T, C, P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. ***J. Chromatogr A.*** 782, p. 199 – 210, 1997.

FAVRE, D.; CHEREL, Y.; PROVOST, N.; BLOUIN, V.; FERRY, N.; MOULLIER, P.; SALVETTI, A. Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. ***Gene Ther.***, v. 7, p. 1417-1420, 2000.

GINN, S.L.; AMAYA, A. K.; ALEXANDER, I.E.; EDELSTEIN, M.L.; ABEDI M.R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017 – an update. ***J Gene Med.***, v. 20, 2018, e 3015.

GREGOR, L.C.; ALATZOGLOU, K.S.; McCABEL, M.J.; HINDMARSH, P.C.; SALDANHA, J.W.; ROMANO, N.; TISSIER, P. Le.; DATTANI M.T. Partial loss of function of the GHRH receptor leads to mild growth hormone deficiency. ***J Clin Endocrinol Metab.*** v. 101, p. 3608-3615, 2016.

GUNAWARDANE K.; HANSEN T. K.; CHRISTIANSEN J. S., et al. Normal Physiology of Growth Hormone in Adults. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.;

2000-. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279056/>>
Acesso em 24 de set de 2019.

HARTMAN, M. L. Physiological regulators of growth hormone secretion. In Growth hormone in adults – Physiological and clinical aspects, Cambridge University Press, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279056/>>
Acesso em 24 de set de 2019.

HIGUTI, E.; CECCHI, C. R.; OLIVEIRA, N. A. J.; LIMA, E. R.; VIEIRA, D. P.; AAGAARD, L.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A. L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. Partial correction of the dwarf phenotype by non-viral transfer of the growth hormone gene in mice: Treatment age is critical. **Growth Horm IGF Res.** v. 26, p. 1-7, 2016.

HIGUTI, E.; CECCHI, C. R.; OLIVEIRA, N. A. J.; VIEIRA, D. P.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A. L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. Growth responses following a single intra-muscular hGH plasmid administration compared to daily injections of hGH in dwarf mice. **Curr. Gene Ther.**, v. 12, p. 437-443, 2012.

HOWARD, S. R.; BUTLER, G. E. An analysis of the clinical and cost effectiveness of growth hormone replacement therapy before and during puberty: should we increase the dose? **Horm. Res. Paediatr.**, v. 79, p. 75-82, 2013.

HUNTER, M.; YUAN, P.; Vavilala, D.; FOX, M. Optimization of protein expression in mammalian cells. **Curr Protoc Protein Sci.** v. 95, p. 1-28, 2019.

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

LAUB, O., RUTTER, W. J. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system. **J Biol Chem.** V. 258, 6043-6050, 1983.

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

LIMA FILHA, E.R. **Otimização de parâmetros de transferência *in vivo* do gene do hormônio de crescimento visando a correção fenotípica de camundongos anões.** São Paulo, USP. 2016.

MILLETA, M.C.; FLÜCK, C.E.; MULLIS, P.E. Targeting GH-1 splicing as a novel pharmacological strategy for growth hormone deficiency type II. **Biochem. Pharmacol.** v 124 , p. 1-9, 2017.

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

OLIVEIRA, N.A.J. **Desenvolvimento de modelos animais de terapia gênica para o hormônio de crescimento utilizando queratinócitos transduzidos e injeção direta de DNA plasmidial.** São Paulo, USP. 2010.

PERONI, C.N.; CECCHI, C.R.; ROSAURO, C.W.; NONOGAKI, S.; BOCCARDO, E.; 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.

- PERONI, C.N.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Animal models for growth hormone gene therapy. **Curr. Gene Ther.** v. 5, p. 493-509, 2005.
- PROUDFOOT, N.J. Ending the message: poly(A) signals then and now. **Genes Dev.**, v. 25, p. 1770-1782, 2011.
- PROUDFOOT, N.J. Transcriptional termination in mammals: stopping the RNA polymerase II juggernaut. **Science.** v. 352, aad9926, 2016.
- ROMERO, C.J.; PINE-TWADELL, E.; SIMA, D.I.; MILLER, R. S.; HE, L.; WONDISFORD, F.; RADOVICK, S. Insulin-like growth factor 1 mediates negative feedback to somatotroph GH expression via POU1F1/CREB binding protein interactions. **Mol Cell Biol.** v. 32, p. 4258-4269, 2012.
- VAN GAAL, E.V.B.; HENNINK, W.E.; CROMMELIN D.J.A.; MASTROBATTISTA E. Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 1053-1074, 2006.
- WANG, W.; WENZHONG, L.; MA, N.; STEINHOFF, G. Non-viral gene delivery methods. **Curr. Pharm. Biotechnol.** v. 14, p. 46-60, 2013.
- YAMASHITA, K.; IKENAKA, Y., KAKUTANI, T.; KAWAHADARA, H.; WATANABE, K. Comparison of human lymphotoxin gene expression in CHO cells directed by genomic DNA or cDNA sequences. **Agric. Biol. Chem.** v. 54, p. 2801-2809, 1990.
- ZANINELLI, D.C.T.; MEISTER, L.H.F.; RADOMINSKI, R.B.; BORBA, V.C.Z.; SOUZA, A.M.; BOGUSZEWSKI, C.L. Eficácia, segurança e aderência ao tratamento de longo prazo com hormônio de crescimento (GH) em adultos com deficiência de GH. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 52, p. 879-888, 2008.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.