AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA IN VIVO DO GENE DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO VISANDO A CORREÇÃO FENOTÍPICA DE CAMUNDONGOS ANÕES

ELIANA ROSA LIMA FILHA

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

São Paulo
2016

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

Otimização de parâmetros de transferência *in vivo* do gene do hormônio de crescimento visando a correção fenotípica de camundongos anões

Eliana Rosa Lima Filha

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

2016

Dedico este trabalho:

À minha mãe, que mesmo distante, sempre me apoiou e com seus sábios conselhos, me guiou sempre para o melhor caminho.

Em memória, ao meu amado pai, que apesar de não estar presente, deixou marcado em mim seus ensinamentos e sempre me fez acreditar que tudo isso seria possível.

Aos meus irmãos que me apoiam e me dão o suporte necessário para superar todas as dificuldades.

Aos meus amigos que me acompanharam e me deram forças e carinho, sempre compartilhando momentos especiais.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado toda força para seguir e por me conceder saúde e sabedoria para superar as dificuldades, escolhendo sempre o melhor caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Cibele Nunes Peroni pela orientação, paciência, amizade, por toda oportunidade, confiança e pelo conhecimento transmitido durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação, apoio, ensinamentos e por acreditar em mim, me incentivando a sempre continuar.

À adorável e sempre “louca” Eliza, por todo ensinamento durante esses 4 anos juntas, por toda ajuda nos experimentos, companheirismo, por dividir momentos de alegrias e desabafos que sempre me ajudaram a levantar a cabeça e seguir, e sobretudo, pela amizade.

Às minhas meninas Thais e Renata, por me aguentarem em casa e no trabalho, pela força quando eu mais precisei, pelo carinho e incentivo quando necessários e pela amizade verdadeira.

Ao Nélio, por tudo que me ensinou, pelos conselhos dados, por todo incentivo que me deu há anos atrás, mas que guardo sempre comigo.

À Claudia, pelos ensinamentos, pela ajuda nos ensaios, pela amizade, companheirismo e carinho.

Aos novos integrantes do grupo de terapia gênica Gustavo e Enio, pela ajuda nos experimentos e pela paciência de me aguentarem nessa fase final do trabalho.

À Neide, Glaucie e Mara, pelo cuidado com os animais, apoio sempre que necessário nos experimentos, amizade e carinho.

Aos amigos que entraram na minha vida através da ciência, mas que se tornaram especiais, Emília, Patrícia, Bruna, Victor, Fernanda, Beatriz, Flavinha, Felipe, Gislaine, Elisangela, Néia e Taís.

Ao Dr. Daniel Perez e Dra. Miriam, por esclarecerem dúvidas quando precisei.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia do IPEN, Teresa, Carlos, Rute, Arlete, Zé Maria, Marina, Rosângela, Johnny e Junqueira.

Aos meus queridos amigos de vida, Ivette, Camila, Mira, Tábata, Amanda Pinheiro, Juliana, Nayara, Laura, Amanda Alves, Anna Carolina, Edna e Meire, por toda amizade, carinho e momentos especiais compartilhados.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por ceder o espaço para realização deste trabalho.

E finalmente agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, me ajudaram a alcançar meu objetivo.

“A vitória sempre foi de quem nunca duvidou dela”.

Raul Follerman

Resumo

LIMA, E.R. Otimização de parâmetros de transferência *in vivo* do gene do hormônio de crescimento visando a correção fenotípica de camundongos anões, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A deficiência de hormônio de crescimento (DGH) é tratada convencionalmente com repetidas injeções do hormônio recombinante. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma alternativa de tratamento baseada na transferência dos genes do hormônio de crescimento humano (hGH) ou de camundongo (mGH), em camundongos anões *lit/lit* ou *lit/scid*, mediante administração de DNA plasmidial associada à eletrotransferência, com a finalidade de atingir a máxima recuperação de crescimento em comparação ao camundongo normal (*catch-up growth*). Inicialmente foi realizada a administração do plasmídeo contendo o gene do mGH no músculo quadríceps exposto ou tibial anterior (TA) não exposto. Utilizando diferentes condições de eletrotransferência, baseadas em pulsos alternados de baixa (100 V/cm) e alta (1000 V/cm) voltagem (HV/LV, HV/8LV) ou em pulsos seguidos de baixa voltagem (8 pulsos de 150 V/cm), o músculo TA na condição HV/LV apresentou os maiores níveis de expressão de mGH: 6,7 ± 2,5 ng/mL. O tempo de exposição e a quantidade da enzima hialuronidase (HI) necessária para a eletrotransferência foram também analisados. O tempo de 30 minutos e a dose de 20 U de HI proporcionaram os melhores resultados de expressão. Diferentes quantidades de DNA foram também testadas, mas a administração de 50 µg DNA/animal foi confirmada como a melhor. Na padronização do volume de solução do plasmídeo administrado no TA, foi observado que a injeção de 20 µL de DNA apresentou expressão significativamente maior da proteína em comparação a de 10 µL. Buscando uma maior expressão de GH, foi realizado experimento adicionando poli-L-glutamato ao diluente do DNA, comparando também diferentes condições de eletrotransferência (HV/LV e 375 V/cm). A condição de 375 V/cm, sem a adição do polímero, proporcionou as maiores concentrações, tanto de hGH como de mGH, no soro de camundongos *lit/scid* e *lit/lit*, respectivamente. Quando utilizados 3 pulsos de 375 V/cm e a administração do plasmídeo com o

gene do mGH em dois locais de cada músculo TA, foram obtidos os mais altos níveis de expressão atingindo 14,7 ± 3,7 ng mGH/mL. Estes foram os parâmetros utilizados em um bioensaio, no qual foi também determinada a medida do comprimento inicial e final do fêmur por radiografia. Neste bioensaio de 36 dias, a curva de crescimento dos camundongos *lit/lit* tratados foi similar a de camundongos heterozigotos não tratados e os níveis de mGH do grupo DNA foram significativamente maiores (P<0,0002) em relação ao grupo controle. Os camundongos tratados também apresentarem concentração de mIGF-I no soro superior a do grupo controle. Considerando os parâmetros de crescimento avaliados, o grupo tratado com DNA apresentou percentuais de incremento altamente significativos em relação ao grupo controle, com P<0,001 para o peso corpóreo e P<0,002 para o comprimento do corpo, da cauda e para ambos os fêmures, com valores de *catch-up* da ordem de 79% para o comprimento dos fêmures. Podemos concluir que foi estabelecida uma metodologia eficiente de transferência gênica não viral, que poderá levar a uma completa normalização de crescimento de camundongos anões mediante utilização de animais mais jovens, como mencionado na literatura e em trabalho recente do nosso grupo.

Palavras-chave: terapia gênica, hormônio de crescimento, camundongos anões, transferência gênica não viral, eletrotransferência.

Abstract

LIMA, E.R. Optimization of *in vivo* transfer parameters of the growth hormone gene aiming at the phenotypic correction of dwarf mice, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Growth hormone deficiency (GHD) is conventionally treated with repeated injections of the recombinant hormone. This work aimed at establishing an alternative treatment based on the transfer of the human (hGH) or mouse growth hormone (mGH) genes into *lit/lit* or *lit/scid* dwarf mice, using plasmid DNA administration associated with electrotransfer, in order to achieve the maximum growth recovery compared to normal mice (catch-up growth). Administration of the plasmid containing the mGH gene was first carried out in the exposed quadriceps or non-exposed anterior tibialis (TA) muscle. Using different electrotransfer conditions, based on alternate pulses of high (1000 V/cm) and low (100 V/cm) voltage (HV/LV, HV/8LV) or consecutive pulses of low voltage (8 pulses of 150 V/cm), the TA muscle in the HV/LV condition showed the highest levels of mGH expression: 6.7 ± 2.5 ng/mL. Exposure time and amount of the enzyme hyaluronidase (HI) required for electrotransfer were also analyzed. The time of 30 minutes and the dose of 20 U HI provided the best results of expression. Different amounts of DNA were also tested, but the administration of 50 µg DNA/animal was confirmed as the best. In the optimization of the volume of plasmid solution administered to TA, it was observed that injection of 20 µL of DNA showed a significantly higher expression of the protein compared with 10 µL. Aiming at a higher GH expression, an experiment was carried out by adding poly-L-glutamate to the DNA diluent, comparing also different electrotransfer conditions (HV/LV and 375 V/cm). The condition of 375 V/cm, without the polymer addition, provided the higher concentrations of both hGH and mGH in the serum of lit/scid or lit/lit mice, respectively. Using 3 pulses of 375 V/cm and administration of mGH-DNA in two locations on each TA muscle, the highest expression levels of up to 14.7 ± 3.7 ng mGH/mL were obtained. These were the parameters utilized in a bioassay, which was also carried out by measurement of the initial and final femur length by radiography. In this 36-day bioassay, the growth curve of treated lit/lit mice was similar to that of heterozygous untreated mice and the mGH levels of DNA group were significantly higher ($P<0.0002$) than the control

group. Treated mice also showed a higher mIGF-I concentration in the serum compared to the control group. Concerning growth parameters, DNA-treated group showed percentages of increase highly significant compared to the control group, with $P<0.001$ for body weight and $P<0.002$ for body, tail and both femurs lengths, with catch-up values of the order of 79% for femur lengths. We can conclude that an efficient non-viral gene transfer methodology has been established, which lead to a complete growth normalization of the dwarf mice through the use of younger animals, as reported in the literature and in a recent paper of our group.

Key words: gene therapy, growth hormone, dwarf mice, nonviral gene transfer, electrotransfer.

Lista de abreviaturas e siglas

BSA	soro albumina bovina
cm	centímetros
cpm	contagem por minuto
DGH	deficiência de hormônio de crescimento
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
ELISA	ensaio imunoenzimático
GH	hormônio de crescimento
hGH	hormônio de crescimento humano
mGH	hormônio de crescimento murino
GHRH	hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRHR	receptor do hormônio liberador do hormônio de crescimento
HV	alta voltagem - “high voltage”
^{125}I	Iodo-125
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina-I
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
lit/lit	camundongos anões
lit/scid	camundongos anões e imunodeficientes
LV	baixa voltagem - “low voltage”
mg	miligramas
ms	milisegundos
ng	nanogramas
n.s.	não significativo

pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
RIA	radioimunoensaio
rpm	rotações por minuto
s	segundos
UBI	promotor da Ubiquitina C
V	volts
µg	microgramas
µL	microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1 Hormônio de crescimento 14
1.2 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH) 15
1.3 Terapia gênica 16
1.4 Eletrotransferência 19
1.5 Hialuronidase (HI) 20
1.6 Poli-L-glutamato 20
1.7 Experiência do nosso grupo de pesquisa 20
2. OBJETIVOS 22
2.1 Objetivo geral 22
2.2 Objetivos específicos 22
3. MATERIAL 23
3.1 Equipamentos e acessórios principais 23
3.2 Principais reagentes para biologia molecular 24
3.3 Equipamentos e materiais utilizados na eletrotransferência de DNA plasmidial25
3.4 Plasmídeos para injeção direta de DNA plasmidial..... 25
3.5 Animais utilizados para injeção de DNA plasmidial..... 26
3.6 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaio 26
3.7 Principal reagente utilizado na dosagem de mGH 27
3.8 Principal reagente utilizado na dosagem de mIGF-I 27
4. MÉTODOS 28
4.1 Amplificação dos plasmídeos 28
4.2 Manutenção dos animais 28
4.3 Genotipagem 28
4.4 Administração *in vivo* de DNA plasmidial seguida de eletrotransferência..... 29
4.5 Padronização da medida do comprimento do fêmur por radiografia 30
4.6 Bioensaio 31
4.7 Dosagem de mGH 32
4.8 Dosagem de hGH 32
4.9 Dosagem de mIGF-I 32
4.10 Cálculo da porcentagem de recuperação de crescimento (*catch-up growth*) 32
4.11 Análise estatística 33

5. RESULTADOS 34

5.1 Genotipagem dos camundongos *lit/lit* e *lit/scid* 34

5.2 Comparação da eficiência de expressão proteica entre os músculos tibial anterior e quadríceps em diferentes condições de eletrotransferência 36

5.3 Determinação do tempo de exposição e da quantidade de hialuronidase 38

5.4 Determinação da quantidade de DNA 40

5.5 Determinação do volume de DNA administrado no músculo TA 41

5.6 Determinação da expressão de hGH utilizando o poli-L-glutamato 42

5.7 Determinação da expressão de mGH utilizando o poli-L-glutamato 43

5.8 Padronização da quantidade de pulsos utilizados para eletrotransferência 44

5.9 Repadronização da quantidade de DNA 45

5.10 Padronização do local e número de injeções em camundongos *lit/lit* 46

5.11 Comparação das medidas de comprimento dos fêmures por paquímetro e radiografia 47

5.12 Bioensaio para avaliação dos parâmetros de crescimento após a administração de DNA plasmidial no músculo tibial anterior de camundongos *lit/lit* 49

6. DISCUSSÃO 55

7. CONCLUSÕES 62

REFERÊNCIAS 64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônio de crescimento

O hormônio de crescimento (GH) faz parte da família dos hormônios estruturais, que é formada por uma série de moléculas regulatórias. É um hormônio protéico de cadeia única, com massa molecular de 22 kDa e 191 aminoácidos, produzido e secretado pelas células somatotróficas da glândula pituitária anterior; sua função é transmitir informações entre células e órgãos, para controle do crescimento, desenvolvimento, reprodução e manutenção da homeostase metabólica (Das et al., 1996). O GH desempenha ações metabólicas que regulam a composição corpórea, o fluído homeostático, o metabolismo da glicose e lipídico, o metabolismo ósseo e a função cardíaca (Hartman, 2000).

A secreção do GH é mediada pelo hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e pela somatostatina (Correa-Silva, 2008). A liberação do GH é regulada por uma complexa inter-relação entre esses dois peptídeos hipotalâmicos secretados em vias independentes e que interagem com secretagogos adicionais do GH, gerando uma liberação pulsátil deste hormônio. O GHRH induz a liberação do GH e regula a magnitude dos pulsos e a somatostatina determina a frequência e a duração dos pulsos. Além destes, outros fatores interferem na secreção do GH, atuando diretamente sobre a hipófise ou sobre a liberação destes fatores hipotalâmicos, tais como neurotransmissores (noradrenalina, serotonina, dopamina, acetilcolina), hormônios periféricos (glicocorticóides, hormônios tireoidianos, esteróides sexuais, insulina) e fatores metabólicos como glicose, ácidos graxos livres, aminoácidos e gordura corporal. A grelina, o estradiol e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) são outros fatores fisiológicos que podem interferir e alterar a secreção do GH. (Le Roith et al., 2001; Da Silva & Lengyel, 2003; Da Silva, 2004; Goldman, 2004; Cázares-Delgadillo et al., 2011; Melmed et al., 2011).

O GH é um hormônio anabólico, indutor de síntese proteica e sua principal função é promover o crescimento linear. Atua no crescimento por dois mecanismos principais: estimula a produção de IGF-I e induz a expansão clonal e a diferenciação dos pré-condrócitos na placa de crescimento epifisária. O GH também desempenha funções na regulação do metabolismo lipídico e aumento da massa muscular

cardíaca e esquelética (Das et al, 1996; Yakar et al., 2000; Le Roith et al., 2001; Alberts et al., 2002; Goldman, 2004; Alba et al., 2005; Portes & Barbosa, 2008).

O IGF-I é um polipeptídeo de aproximadamente 7 kDa, responsável por várias atividades promovidas pelo GH no crescimento e é regulador direto do receptor de GH. Ele também participa de um sistema regulatório de *feedback* negativo no hipotálamo e na hipófise; quando há aumento na sua concentração, ocorre a liberação de somatostatina e a inibição da secreção do GH na hipófise anterior. Dessa forma, quando há alterações nos níveis de GH produzido, a liberação de IGF-I também é afetada (Donahue et al, 1993; Klover et al, 2007; Melmed et al, 2011). O fígado é o principal órgão produtor de IGF-I, e é onde ocorre a ligação do GH aos seus receptores, estimulando a expressão do gene do IGF-I e sua liberação sistêmica, atuando assim, no crescimento, estimulando a divisão das células primárias da epífise dos ossos longos (Yakar et al., 2000; Le Roith, 2003; Cázares-Delgadillo et al., 2011).

1.2 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH)

A deficiência de hormônio de crescimento (DGH) é uma das deficiências de hormônios pituitários mais frequentes. Indivíduos portadores de DGH apresentam peso corpóreo comprometido, discreta adiposidade abdominal, reduzida massa muscular e um crescimento geralmente lento. Quando essa deficiência ocorre em adultos há uma redução da massa magra, sobrepeso, redução da capacidade física, falta de concentração, perda de memória, aumento de fatores de risco cardiovascular e resistência à insulina, entre outros. Essa deficiência pode ter causas adquiridas, idiopáticas ou congênitas, pode também ser completa ou parcial (Da Silva, 2004).

A DGH é uma condição crônica que necessita de reposição de GH por um longo período da vida e os principais objetivos são a normalização do crescimento durante a infância, até atingir o tamanho normal de um indivíduo na idade adulta, além de garantir uma melhor qualidade de vida para esses indivíduos (Rocha et al., 2008; Kemp, 2010; Molitch, 2011; Bank et al., 2012; Cook & Rose, 2012).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, houve um avanço significativo no tratamento da DGH, uma vez que se tornou possível sintetizar grandes quantidades do hormônio de crescimento humano recombinante (r-hGH). Assim, a disponibilidade deste hormônio em alta pureza tornou-se praticamente ilimitada. Este fato facilitou o tratamento, em substituição à utilização do hormônio de origem hipofisária empregado até o momento, além de desvantagens inerentes à proteína natural humana, como a presença de príons. Entretanto, a administração da proteína recombinante apresenta algumas desvantagens, como os dispendiosos processos de purificação, o que eleva os custos do tratamento. Além da necessidade de frequentes injeções, de acordo com as características e severidade da DGH, o tratamento ideal seria aquele em que deveria ser evitado este tipo de inconveniência, e fosse utilizado um mecanismo de liberação da proteína mais semelhante ao processo natural, visando também garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Uma alternativa que pode levar à correção dos defeitos clínicos é apresentada pela transferência gênica de hGH em células somáticas do paciente, tanto *in vivo*, com *ex vivo* (Bellini et al., 2003; Peroni et al., 2005; Khamaisi et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Alatzoglou & Dattani, 2010; Alatzoglou et al., 2014).

1.3 Terapia gênica

A terapia gênica é um método que pode ser definido pela introdução e expressão de genes recombinantes em células somáticas para tratamento de diversas doenças. Uma vez que o gene de interesse é inserido na célula, a nova informação genética utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para expressar estes produtos gênicos. O DNA é utilizado como um agente farmacológico para induzir mudanças terapêuticas, e desta forma, o transgene será herdado para as células descendentes, e a terapia poderá ser mantida após a administração de uma única dose do gene (Garlick & Fenjves, 1996).

Duas abordagens principais de terapia gênica são utilizadas: *in vivo* e *ex vivo* (Figura 1). Na terapia *in vivo*, os genes que irão substituir a função dos seus homólogos defeituosos, são transferidos diretamente para os tecidos do indivíduo utilizado no estudo. Na terapia *ex vivo*, células são removidas do indivíduo e

cultivadas em laboratório. Nessas células é realizada a transferência do gene de interesse e, em seguida, as células modificadas são selecionadas, assim aquelas que receberam o gene são reimplantadas no paciente (Strachan & Read, 1999; Nayerossadat et al., 2012).

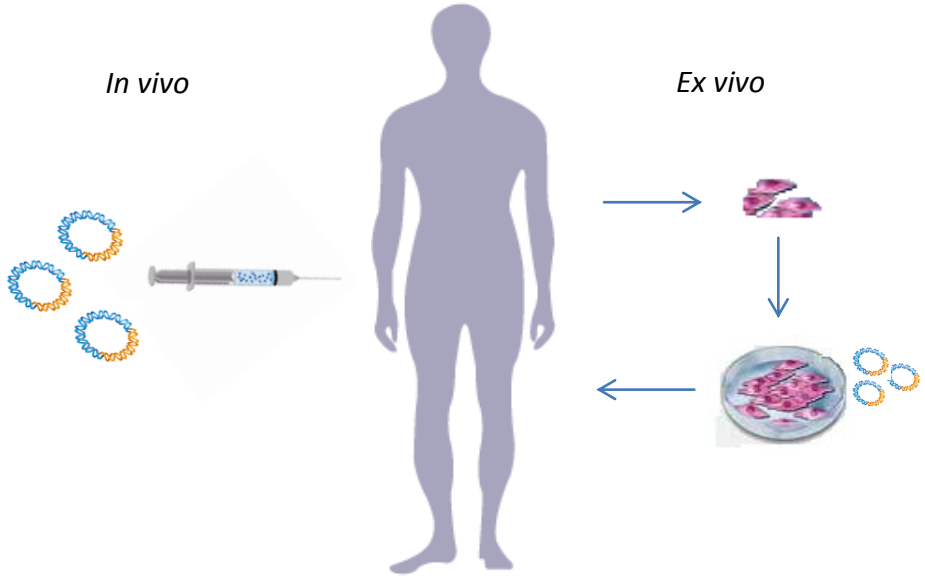

Figura 1: Esquema das estratégias de terapia gênica *ex vivo* e *in vivo* (Cecchi, 2013).

Um dos métodos de transferência gênica não-viral mais utilizados atualmente é a injeção direta de DNA plasmidial ou *naked DNA*. É um método simples e prático, de relativo baixo custo, cujo potencial pode ser inclusive verificado pelo seu crescente aumento, alcançando aproximadamente 18% dos protocolos clínicos de terapia gênica, que somam mais de 2000 aprovados desde 1989 (Figura 2) (Ginn et al., 2013; Wang et al., 2013; Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2015). Esse método pode ser realizado em diversos tecidos, como músculo, pele, fígado, entre outros. Entre estes, o músculo é o tecido mais utilizado por oferecer várias vantagens, como ser de fácil acesso, constituir mais de 40% de toda a massa corpórea, ser altamente vascularizado, possuir a capacidade de produzir e secretar proteínas que podem atingir a circulação (Bigey et al., 2002; Fattori et al., 2002;

Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 2003; Bloquel et al., 2004; Ratanamart & Shaw, 2006).

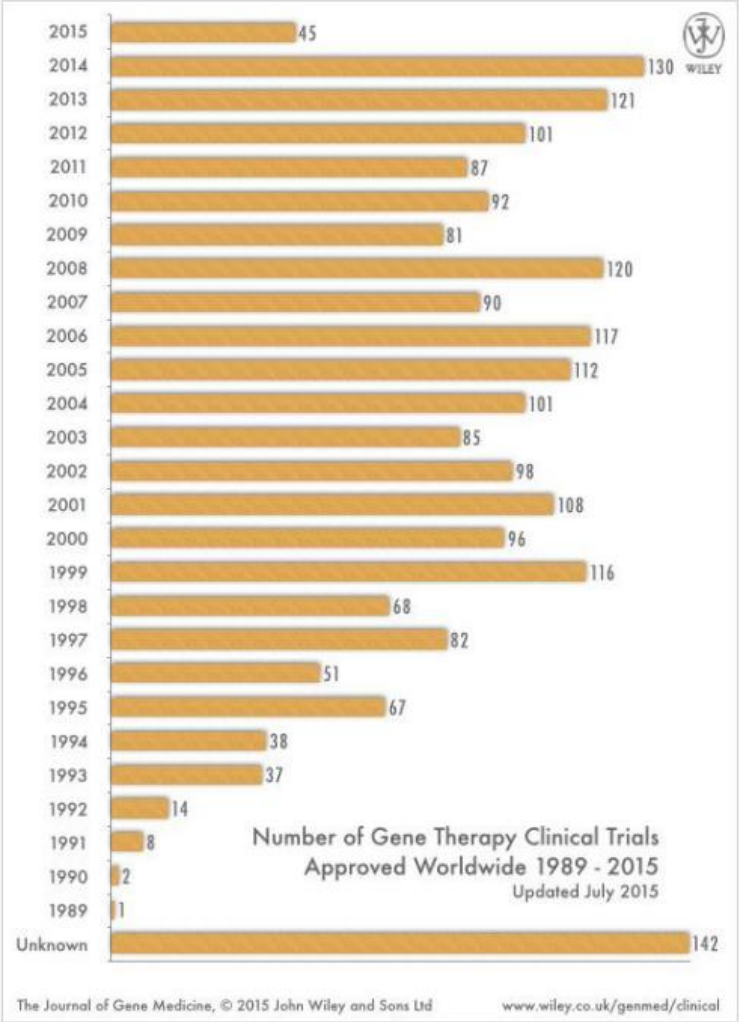

Figura 2: Protocolos clínicos de terapia gênica aprovados mundialmente a partir 1989 (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2015; Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials, 2015).

Entretanto, o potencial de utilização desta técnica para aplicação em humanos é limitado pela baixa eficiência da expressão e alta variabilidade no nível de expressão gênica. Diferentes métodos físicos são utilizados em conjunto com a injeção direta de DNA plasmidial para aumentar a eficiência desta metodologia, e uma das mais promissoras é a eletrotransferência.

1.4 Eletrotransferência

A eletrotransferência consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos, controlados e alternados no tecido-alvo após a injeção do DNA plasmidial, induzindo uma diferença de potencial transmembrana na célula e criando poros transientes na superfície celular (Figura 3). Dessa maneira, o plasmídeo é alvo de um efeito eletroforético, que promove a migração e entrada desse material genético no núcleo das células. Em condições otimizadas dos parâmetros para a eletrotransferência, é possível obter excelentes níveis de permeabilização e sobrevivência celular (Mir et al., 1999; Fattori et al., 2002; Bloquel et al., 2004; Ratanamart & Shaw, 2006).

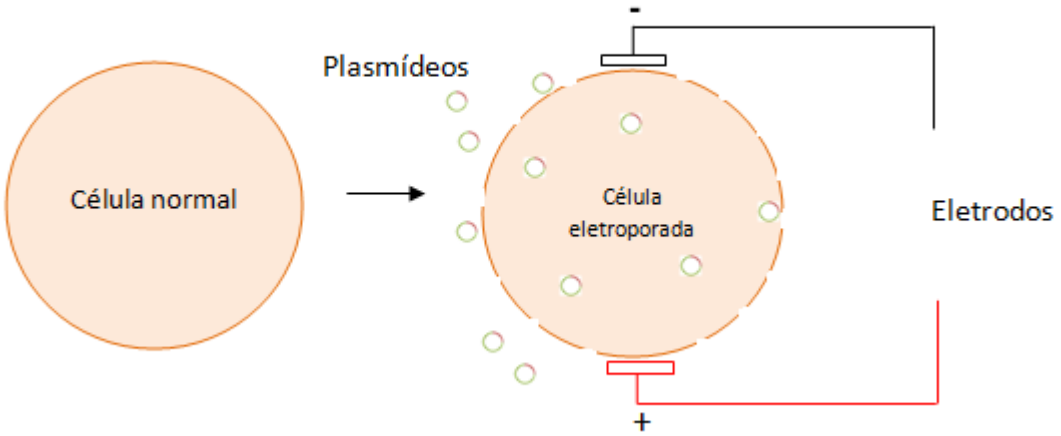

Figura 3: Esquema do comportamento da membrana celular após eletrotransferência.

A administração direta de um plasmídeo, seguida de eletrotransferência, tem demonstrado sua eficiência e potencial aplicação no tratamento de diferentes doenças sistêmicas como hemofilia, anemia crônica, diabetes mellitus, deficiência de hormônios peptídicos e em infecções da mucosa intestinal (Fattori et al., 2005; Ratanamart & Shaw, 2006; Prud'homme et al., 2007; Bodles-Brakhop et al., 2009; Gothelf et al., 2010; Shoji et al., 2012).

O emprego desta técnica no músculo e na pele tem demonstrado resultados satisfatórios com vários genes, entre eles o da eritropoietina (Epo), do hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) e do hormônio de crescimento humano (hGH) e murino (mGH) (Rizzuto et al., 1999; Fattori et al., 2005; Prud´homme et al., 2006; Miyazaki & Miyazaki, 2008; Brown et al., 2009; Khan et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014; Higuti et al., 2016).

1.5 Hialuronidase (HI)

A hialuronidase é uma enzima que possui a capacidade de facilitar a entrada do DNA plasmidial nas fibras musculares por catalisar a hidrólise do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo viscoso, componente essencial da matriz extracelular. Assim, esta enzima diminui a viscosidade intercelular, aumentando temporariamente a permeabilidade e absorção dos tecidos, podendo aumentar os níveis de expressão de uma proteína (Favre et al., 2000). Temos utilizado uma quantidade fixa de hialuronidase (20 U), porém foi relatado que a variação da mesma alterou os níveis de eritropoetina em camundongos que receberam injeção com o gene desta proteína, seguida de eletroporação (Mennuni et al., 2002).

1.6 Poli-L-glutamato

O poli-L-glutamato é um polímero que tem a capacidade de proteger o plasmídeo contra degradação de endonucleases, promovendo a formação de um complexo mais flexível para difundir no tecido muscular. É um polímero carregado negativamente, que promove a retenção do plasmídeo no músculo esquelético por mais tempo, evita a perda da estabilidade do complexo formado, aumentando a distribuição do DNA no interior do tecido muscular, que por sua vez, possibilitaria um aumento da expressão do transgene (Fewell et al., 2001; Nicol et al., 2002; Mc Mahon & Wells, 2004).

1.7 Experiência do nosso grupo de pesquisa

Nosso grupo desenvolve uma linha de pesquisa no campo da terapia gênica para DGH, utilizando uma técnica não viral de injeção direta de DNA plasmidial (*naked* DNA). Esta metodologia é realizada utilizando a administração de plasmídeos contendo os genes do hormônio de crescimento humano (hGH) ou de camundongo (mGH), associada à técnica de eletrotransferência, para aumentar a eficiência da injeção direta do DNA plasmidial. Os plasmídeos são injetados nos músculos quadríceps ou tibial anterior de camundongos anões (*lit/lit*) e anões

imunodeficientes (*lit/scid*). Com a utilização deste sistema, níveis de secreção de hGH foram mantidos por um período de 60 dias na circulação dos camundongos *lit/scid*, com níveis de 1,5 a 3,0 ng hGH/mL. Em um ensaio de longa-duração, foi obtido um ganho de peso significativo nos animais que receberam o plasmídeo, de aproximadamente 30%, quando comparados ao grupo controle de animais, injetados com solução salina (Oliveira et al., 2010). Nesse ensaio, o grupo que recebeu DNA apresentou diferença significativa em relação ao grupo que recebeu salina, para a maioria dos órgãos e tecidos avaliados, com destaque para o crescimento do músculo quadríceps direito, no qual foi injetado o DNA, que apresentou um aumento de peso de 48%, enquanto o músculo esquerdo não injetado apresentou um aumento de 31%, indicando um efeito autócrino/parácrino e endócrino, quanto à expressão de hGH e mIGF na circulação destes animais.

Em uma publicação subsequente (Higuti et al., 2012), foi realizado um estudo comparativo entre esta metodologia de terapia gênica para DGH e a administração diária do hormônio recombinante (r-hGH), durante 28 dias, em camundongos *lit/scid*. Os resultados demonstraram que a estratégia utilizando a terapia gênica é viável para o tratamento da DGH.

Foi também utilizado um modelo homólogo de eletrotransferência, no qual um plasmídeo contendo o gene do mGH foi administrado em camundongos imunocompetentes *lit/lit*. Com este modelo, em um ensaio de 3 meses, foi obtido um aumento do peso corpóreo desses animais de 34%, equivalente a um *catch-up growth* (porcentagem de recuperação de crescimento do camundongo anão em relação a um camundongo normal) de 16% (Cecchi et al., 2014).

Em um trabalho mais recente (Higuti et al., 2016), foi utilizada uma técnica menos invasiva de eletrotransferência no músculo tibial anterior não exposto e camundongos *lit/scid* mais jovens (de 40 dias de idade). Nessas condições foram obtidos, pela primeira vez, níveis de mIGF-I comparáveis aos dos camundongos normais (*scid*), após 15 dias da administração do plasmídeo, além de um *catch-up-growth* de 77% para o comprimento do fêmur.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho é estabelecer uma metodologia eficiente de transferência gênica no camundongo anão *lit/lit* ou *lit/scid*, com a finalidade de atingir a máxima recuperação de crescimento em relação ao camundongo normal (*catch-up growth*).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a genotipagem dos camundongos;
- Comparar a eficiência de expressão da proteína de interesse entre os músculos tibial anterior e quadríceps;
- Otimizar a quantidade e o tempo de exposição da enzima hialuronidase, utilizada para facilitar a penetração do plasmídeo nas fibras musculares;
- Otimizar a quantidade e volume de DNA a ser injetado no músculo;
- Utilizar o poli-L-glutamato para aumentar a expressão protéica;
- Aumentar o número de locais de injeção do plasmídeo no músculo;
- Comparar a determinação do comprimento do fêmur utilizando paquímetro e radiografia;
- Realizar um bioensaio de crescimento com as condições otimizadas.

3. MATERIAL

3.1 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador magnético modelo 258 – FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162 – MARCONI (São Paulo, SP, Brasil);
- Autoclave vertical, modelo 103 – FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Banho-maria, modelo 146, FANEN (São Paulo, SP, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurique, Suíça);
- Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurique, Suíça);
- Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B – SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5810R, EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- Contador gama automático 2470 Wizard 2, PERKIN ELMER (Walthan, 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 -20º C, modelo 0651 – PROSDÓCIMO (São Paulo, SP, Brasil);
- Freezer -40º C, modelo AB 240 – METALFRIO (São Paulo, SP, Brasil);
- Freezer -80º C, modelo 8425 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH (Bethesda, EUA);
- Microcentrífuga, modelo 5415P - EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);

- Micropipetas LABMATE SOFT Monocanal de volume variável: 10µL, 100 µL, 200 µL e1000 µL- HTL (Varsóvia, Polônia);
- Nanodrop - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- Pet spect CT - Albira Bruker (Billerica, 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).

3.2 Principais reagentes para biologia molecular

- Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- 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);
- Sistema para extração de DNA - REDExtract-NAmp Tissue™ PCR – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA);
- Marcador de peso molecular de 100 pb e 1 kb Gene RulerTM – 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 - BactoTM Tryptone – BECTON DICKINSON (Sparks, MD, EUA).

3.3 Equipamentos e materiais utilizados na eletrotransferência de DNA plasmidial

- Eletroporador ECM-830 - BTX (Holliston, MA, EUA);
- Eletrodo do tipo paquímetro, utilizando uma distância de 3 mm entre as placas de 1,0 x 1,0 cm - BTX (Holliston, MA, EUA);
- Eletrodos do tipo placa (um par), de platina pura de 5,5 x 2,0 x 3,0 mm, não invasivos - HERAEUS VECTRA DO BRASIL (São Paulo, SP, Brasil);
- Gel eletrocondutor Flexor – FLEXOR (Sertãozinho, SP, Brasil);
- Hialuronidase - Hyalozima 2.000 UTR – APSEN (São Paulo, SP, Brasil);
- Isoflurano - CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil)
- Máquina de corte elétrico para barba - GAMA ITALY (Bolonha, Itália);
- Paquímetro digital -MITUTOYO (Suzano, SP, Brasil);
- Poli-L-glutamato - SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA);
- 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).

3.4 Plasmídeos para injeção direta de DNA plasmidial

- pUC-UBI-hGH: possui o promotor da ubiquitina C (posição de 1464 a -15 pb) e a sequência genômica do hGH (2,2 kb), foi cedido pelo Dr. T. G. Jensen (Departamento de Biomedicina, Universidade de Aarhus, Dinamarca) e tem sido utilizado por nosso grupo (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012 e 2016).

- pUC-UBI-mGH: construído a partir do pUC-UBI-hGH, do qual foi retirada a sequência do gene do hGH para inserção da sequência genômica do GH de camundongo (mGH) de 1,6 kb (Cecchi et al., 2014).

3.5 Animais utilizados para injeção de DNA plasmidial

- Camundongos anões da linhagem C57BL/6J-GHRHRLIT/+ (*lit/lit*), adquiridos da empresa *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA) e mantidos no Biotério do IPEN-CNEN/SP.

- Camundongos anões e imunodeficientes da linhagem CB17-Ghrhr lit/+ *Prkdc scid/Bm*, mais conhecidos como *lit/scid*, que possuem uma mutação espontânea de origem recessiva no gene do GHRHR, no cromossomo 6, originando o nanismo (Deitel et al., 2002) e outra mutação autossômica recessiva originada no gene Prkdc, situada no cromossomo 16, que lhes confere uma imunodeficiência severa. Foram também obtidos da *The Jackson Laboratory* e mantidos no IPEN.

3.6 Preparações padrão, antissoros e reagentes para radioimunoensaio

- 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 Imunnoassay Plus Control (níveis 1, 2 e 3) - BIORAD - INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Cloramina T p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfato de sódio bibásico p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico p.a. - MERCK (São Paulo, SP, Brasil);
- Metabissulfito de sódio - CARLO ERBA (São Paulo, SP, Brasil);
- ^{125}I comercial, livre de carreadores e oxidantes, com atividade específica de 11.100-22.200 MBq/mL (300-600 mCi/mL) - NORDION EUROPE S.A. (Fleurus, Bélgica);
- Preparação de hGH recombinante altamente purificado para iodação - IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil) (Ribela et al., 1993; Oliveira et al., 1999);

- Resina cromatográfica Sephadex G100 - GE HEALTHCARE BIOSCIENCES (Piscataway, NJ, EUA);
- Segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro - IPENCNEN/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).

3.7 Principal sistema utilizado na dosagem de mGH

- *Rat/Mouse Growth Hormone ELISA kit* - MILLIPORE (St. Charles, MO, EUA).

3.8 Principal sistema utilizado na dosagem de mIGF-I

- *Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-I kit* - R&D SYSTEM (Minneapolis, MN, EUA).

4. MÉTODOS

4.1 Amplificação dos plasmídeos

O plasmídeo pUC-UBI-hGH foi transformado em bactérias competentes E. coli DH5α, amplificado em meio LB com ampicilina e purificado utilizando o sistema para extração de *DNA Xtra Midi/Maxi - Nucleobond Macherey-Nagel.* A quantificação do plasmídeo purificado foi realizada por leitura espectrofométrica e a presença do inserto correspondente à sequência genômica do hGH confirmada por análise de restrição, utilizando as enzimas *Bam HI* e *Eco RI.*

O plasmídeo pUC-UBI-mGH também foi transformado em bactérias competentes E. coli DH5α, amplificado e purificado utilizando o mesmo sistema mencionado acima. Para a análise de restrição foram também utilizadas as enzimas *Bam HI* e *Eco RI*.

4.2 Manutenção dos animais

Os camundongos *lit/lit* e *lit/scid* foram mantidos em gaiolas plásticas (microisoladores), em estantes ventiladas à temperatura de 22 ± 2 ºC, sob condições livres de patógenos e alimentados com ração padrão e água. Os animais utilizados nos experimentos tinham idade entre 60 e 90 dias, machos e fêmeas (Bellini et al., 2003).

A utilização desses camundongos foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) – Projeto Nº 145/14 e as nossas instalações possuem o Certificado de Qualidade em Biossegurança número CQB 0067/98.

4.3 Genotipagem

A genotipagem dos camundongos *lit/lit* e *lit/scid* foi realizada para confirmar a presença da mutação que confere o nanismo (*little*), uma vez que havia dificuldade de reprodução desses animais. Foram coletadas amostras de tecido da orelha dos animais e o DNA foi extraído e amplificado por PCR, seguindo instruções do fabricante.

O primer *forward* possui 18 pares de bases e o *reverse* 20 pares, com a seguinte sequência:

FORWARD – 5' – GATGCCCTGGGACCTGGG- 3'

REVERSE – 5' – ACCAGAAGGAACCACATGCT- 3'

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

94º C – 2 h e 30 minutos

94º C - 30 minutos
58º C - 30 minutos
72º C - 1 minuto
} 40 ciclos

72º C - 4 minutos

10º C - ∞

Após a amplificação do DNA, realizou-se a digestão das amostras com a enzima BseGI. As amostras foram analisadas em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio (1mg/mL). A agarose foi dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e aquecida por 45 segundos. Após o resfriamento da solução, foi adicionado 1 µL da solução estoque de brometo de etídio para permitir a visualização das bandas de interesse e todo conteúdo foi despejado em uma cuba própria para eletroforese, permanecendo até sua completa polimerização. Foi utilizado o marcador de massa molecular de 100 pb. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 80 volts durante 1 hora e 30 minutos e visualizado em luz ultravioleta.

4.4 Administração *in vivo* de DNA plasmidial seguida de eletrotransferência

Os camundongos *lit/scid* ou *lit/lit* foram previamente anestesiados com uma mistura de xilazina e quetamina, via intraperitoneal. Os pelos da região do músculo tibial anterior (TA) ou quadríceps direitos foram retirados, onde foi injetada a enzima hialuronidase em diferentes concentrações, incluindo a já utilizada por nosso grupo (20 U/20 µL). Quando não especificado, após 30 minutos, foi injetado o plasmídeo pUC-UBI-hGH ou pUC-UBI-mGH, em diferentes doses diluídas em 20 µL de solução salina. Em seguida, foi realizada a eletrotransferência no músculo quadríceps exposto ou TA não exposto, utilizando diferentes parâmetros: (a) 1 pulso curto de

alta voltagem (800 V/cm de 100 µs) e 1 pulso longo de baixa voltagem (100 V/cm de 400ms), denominada HV/LV (Hojman et al., 2011); (b) 1 pulso de 375 V/cm e 25 ms (Nicol et al., 2002); ou (c) 8 pulsos de 150 V/cm, com duração de 20 ms e intervalo de 0,5 s entre os pulsos (Oliveira et al., 2010).

Foi também realizado um teste com diferentes volumes (10 e 20 µL) de solução do plasmídeo pUC-UBI-hGH, no TA de camundongos *lit/scid,* utilizando a eletrotransferência HV/LV.

Uma comparação entre as voltagens HV/LV e 375 V/cm foi realizada para otimizar esses parâmetros de eletroporação no músculo TA dos *lit/scid,* administrando-se 20 µL do plasmídeo contendo o gene do hGH.

Em outro experimento, injetou-se o plasmídeo pUC-UBI-hGH acrescido do poli-L-glutamato de 15-50 kDa, diluído em solução salina em uma concentração de 6 mg/mL, no músculo TA de camundongos *lit/scid*. Após 30 minutos de exposição à enzima hialuronidase, a eletroporação foi realizada em duas diferentes voltagens, HV/LV e 375V/cm. Para confirmar os resultados obtidos com a adição do polímero, o mesmo tipo de ensaio foi realizado administrando o plasmídeo pUC-UBI-mGH em camundongos *lit/lit*.

Foi também realizado um ensaio variando-se a quantidade de pulsos (1, 2 ou 3) na condição de 375 V/cm, utilizando o plasmídeo pUC-UBI-mGH em camundongos *lit/lit*.

Buscando uma maior expressão de mGH, camundongos *lit/lit* foram injetados em diferentes locais do músculo tibial anterior. Foram feitas duas injeções de 50 µg/20 µL do plasmídeo pUC-UBI-mGH no mesmo músculo ou duas injeções em cada músculo, seguidas de 3 pulsos de 375 V/cm.

Em todos os experimentos, como controle negativo foi administrada solução salina em um volume de 20 µl/animal, seguida de eletrotransferência. Todos os grupos foram de n=3 animais e o sangue foi coletado após 3 dias da eletrotransferência para a determinação de mGH ou hGH.

4.5 Padronização da medida do comprimento do fêmur por radiografia

Um bioensaio de 28 dias foi realizado utilizando dois grupos de camundongos *lit/scid*, um grupo recebeu 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH no TA e foi submetido à eletrotransferência HV/LV, já o segundo grupo recebeu solução salina nas mesmas condições. Um equipamento PET SPECT CT foi utilizado para obter a medida de comprimento dos fêmures de todos os animais no início e no final do tratamento. Os animais foram colocados, um de cada vez, numa câmara do próprio sistema, onde foram anestesiados com isoflurano numa concentração de 0,2 a 3% (1-2 mL/min), até a total ausência de reflexos. A anestesia foi mantida durante toda a radiografia e as imagens foram geradas utilizando o programa *Image J*. Após a obtenção das imagens pelo programa, os animais foram sacrificados e os fêmures dissecados para serem medidos também com paquímetro digital, como realizado rotineiramente em nosso laboratório.

4.6 Bioensaio

Foi realizado um bioensaio utilizando as condições padronizadas, no qual camundongos *lit/lit* foram submetidos à injeção de 20 U de HI e após 30 minutos de exposição, injetou-se duas doses de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH em ambos os músculos TA, seguido de eletrotransferência com 3 pulsos de 375 V/cm. Os animas foram acompanhados e pesados por 36 dias, quando o soro foi coletado para dosagem de mGH e mIGF-I. Os animais foram submetidos à medida do comprimento inicial e final dos fêmures por radiografia; no final do ensaio foram determinados os comprimentos total do corpo e da cauda por paquímetro e pesados os músculos quadríceps e TA. Neste ensaio utilizou-se um n=7 para o grupo DNA, n=5 para o grupo salina e n=4 para o grupo de animais heterozigotos utilizados como controle positivo.

4.7 Dosagem de mGH

A dosagem de mGH no soro dos camundongos foi realizada utilizando o sistema comercial *Rat/Mouse Growth Hormone ELISA kit*, com sensibilidade de 0,07 ng mGH/mL. É um método imunoenzimático quantitativo do tipo “sanduíche”, onde uma microplaca de 96 poços é revestida com um anticorpo monoclonal específico e o anticorpo policlonal de detecção é conjugado à peroxidase. A leitura foi realizada em um leitor de placas de microtitulação na absorbância de 450 nm.

4.8 Dosagem de hGH

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

4.9 Dosagem de mIGF-I

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

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

O *catch-up growth* (CG), porcentagem de recuperação de crescimento dos camundongos *lit/lit* tratados com mGH em relação aos camundongos heterozigotos, foi calculado utilizando o peso corpóreo (g) ou comprimento total do corpo (cm), da cauda (cm), do fêmur (mm), peso dos músculos quadríceps ou tibial (mg), ou a concentração de mIGF-I, de acordo com a seguinte fórmula:

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

onde:

Wt = pesos ou comprimentos ou concentração de mIGF-I do grupo tratado com mGH;

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

Wn = pesos ou comprimentos ou concentração de mIGF-I do grupo de animais heterozigotos, não tratados.

Todas as medidas e concentrações foram obtidas ao final do bioensaio.

4.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste *t* de *Student*, considerando-se não significativo $P>0,05$. Os dados foram apresentados como valores médios ± desvio padrão (DP).

Os múltiplos grupos foram analisados utilizando o programa estatístico *Graphpad Prism* (versão 5.0 GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), mediante análise de variância "*two way* ANOVA" e quando houve diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados com o grupo controle utilizando o pós-teste de Bonferroni.

A curva de crescimento dos camundongos, no bioensaio, foi ajustada de acordo com uma função polinomial quadrática de segunda ordem: $Y = B_0 + B_1X + B_2 X^2$.

5. RESULTADOS

5.1 Genotipagem dos camundongos *lit/lit* e *lit/scid*

Para confirmação da mutação *little*, foram extraídas amostras de DNA a partir de um fragmento da orelha de cada animal, antes da realização dos ensaios. As amostras foram submetidas à PCR, digestão enzimática e gel de agarose, como descrito nos métodos. Quando visualizadas duas bandas no gel, uma na altura de 135 pb e uma segunda na altura de 23 pb, os animais correspondentes são identificados como homozigotos não portadores da mutação e de tamanho normal. Os heterozigotos, que também possuem tamanho normal, são aqueles que apresentam bandas na altura de 158, 135 e 23 pb, enquanto os anões (*lit/lit),* que possuem tamanho reduzido, são os animais cujas amostras apresentam bandas correspondentes a 158 e 23 pb, conforme é mostrado na Tabela 1 e Figura 4.

Tabela 1: Interpretação da genotipagem dos camundongos *lit/lit,* de acordo com os tamanhos das bandas obtidas em gel de agarose, após PCR e digestão das amostras de DNA

Tamanho esperado das bandas (pb)	Fenótipo	Genótipo
158 e 23	Anão	Portador homozigoto $GHRHR^{LIT}$/+(*lit/lit*)
158, 135 e 23	Normal	Portador heterozigoto (*lit*/+)
135 e 23	Normal	Não portador (+/+)

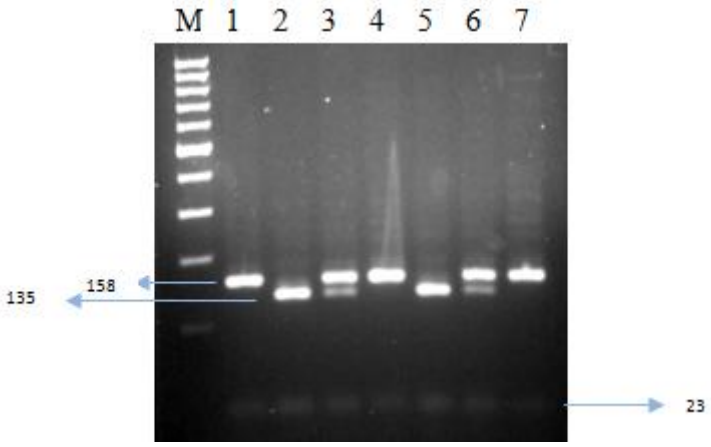

Figura 4: Gel de agarose exemplificando a genotipagem de camundongos *lit/lit*. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb, (1) controle positivo – *lit/lit*, (2) controle negativo- animal normal, (3 e 6) animais heterozigos, (4 e 7) animais anões, (5) animal normal. Amostras de 1 – 7 foram digeridas com a enzima BseGI.

A partir desses resultados, passou-se a realizar a genotipagem dos casais utilizados para cruzamento e formação da linhagem $GHRHR^{LIT}$/+(*lit/lit*), planejando os cruzamentos da seguinte maneira:

Primeiro cruzamento - ♀ heterozigoto x ♂ homozigoto = 50% heterozigoto + 50% homozigoto.

Segundo cruzamento - ♀ heterozigoto x ♂ heterozigoto = 25% não portador + 25% anão + 50% heterozigoto.

O primeiro tipo de cruzamento foi o mais utilizado devido à maior taxa de nascimento de anões.

Este mesmo procedimento está sendo utilizado para a linhagem dos *lit/scid*.

5.2 Comparação da eficiência de expressão proteica entre os músculos tibial anterior e quadríceps em diferentes condições de eletrotransferência

Foi realizado um experimento para estudar o local a ser administrado o DNA plasmidial, utilizando o músculo quadríceps exposto (já utilizado pelo grupo) ou o tibial anterior (TA) não exposto, o qual apresentaria as vantagens de ser um procedimento menos invasivo, mais prático e seguro. Os camundongos *lit/lit* foram submetidos à injeção do plasmídeo pUC-UBI-mGH e à eletrotransferência em diferentes condições. Conforme é mostrado na Figura 5, o grupo TA apresentou uma concentração de mGH no soro de 6,7 ± 2,5 ng/mL, após eletrotransferência na condição HV/LV: 1 pulso de 800 V/cm e 100 µs e 1 pulso de 100 V/cm e 400 ms. Esta concentração foi significativamente maior ($P<0,03$) que a de 3,4 ± 0,4 ng/mL, obtida pelo grupo quadríceps com exposição e parâmetros antigos de eletrotransferência (8 pulsos de 150 V/cm, com duração de 20 ms e intervalo de 0,5s); e superior à concentração de 1,5 ± 2,7 ng/mL, obtida para o grupo tibial com 8 pulsos de 150 V/cm. Foi também testada uma condição com um pulso alto de 1000 V/cm e 100 µs e 8 pulsos baixos de 70 V/cm de 400 ms (HV/8LV) no músculo tibial, que apresentou 5,7 ± 0,5 ng mGH/mL. O grupo salina não apresentou concentração de mGH detectável no soro.

Ressaltamos que neste experimento não foi avaliada a eletrotransferência no músculo quadríceps não exposto, pois em outro trabalho (Cecchi et al., manuscrito em preparação) já havíamos observado que esta estratégia não proporciona níveis satisfatórios de expressão da proteína de interesse.

A partir desses resultados, foi padronizada a utilização do músculo TA, seguida da eletrotransferência HV/LV.

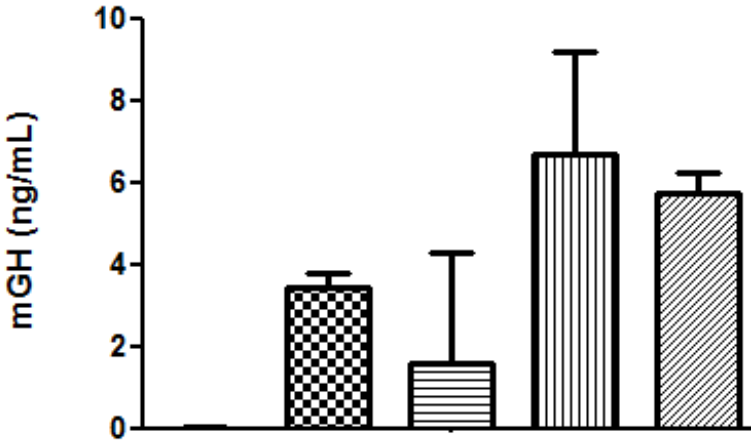

Figura 5: Níveis de mGH obtidos no soro de camundongos *lit/lit* injetados no músculo quadríceps ou tibial anterior com 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH, seguido de eletrotransferência, utilizando diferentes parâmetros. (▩) Salina, (▩) quadríceps com exposição e 8 pulsos de 150 V/cm, (▤) TA sem exposição e 8 pulsos de 150 V/cm, (▥) TA sem exposição e HV/LV, (▨) TA sem exposição e HV/8LV. n=3 animais/condição.

5.3 Determinação do tempo de exposição e da quantidade de hialuronidase

Foi realizado um ensaio para otimização do tempo de exposição da enzima hialuronidase (HI) administrada no músculo tibial anterior dos camundongos *lit/lit*. Na Figura 6 é apresentada a concentração do hormônio de crescimento murino (mGH) no soro dos animais, determinada 3 dias após a administração do DNA plasmidial. Verificamos que os camundongos nos quais a enzima permaneceu 30 minutos em contato com as fibras musculares apresentaram uma concentração de 2,2 ± 0,6 ng/mL de mGH, enquanto os animais dos tempos 15 e 45 minutos apresentaram 1,4 ± 1,0 e 1,8 ± 0,9 ng/mL, respectivamente e os injetados com salina 0,7 ± 0,2 ng/mL. Portanto, o tempo de 30 minutos de exposição à HI continuará a ser utilizado por questões de praticidade técnica, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos.

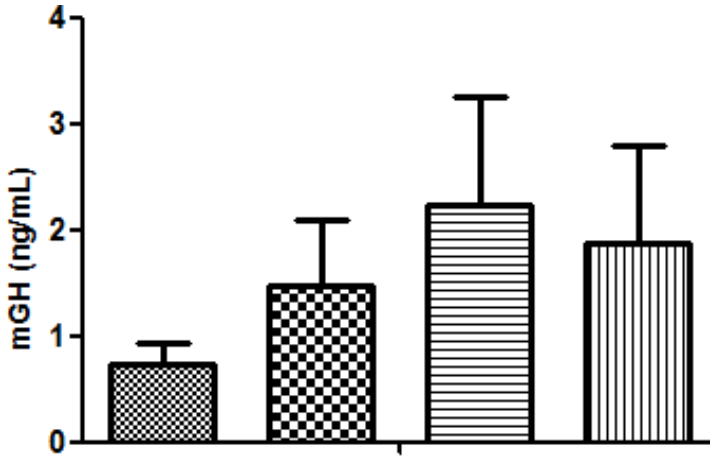

Figura 6: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit,* após diferentes tempos de exposição do músculo tibial anterior à enzima hialuronidase e eletrotransferência de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH na condição HV/LV. (▩) Salina, (▩)15 minutos, (▤) 30 minutos e (▥) 45 minutos. (n=3 animais/condição).

Foi também avaliada a quantidade de HI, administrando-se diferentes doses em um ou nos dois músculos TA. Na Figura 7 é apresentada a concentração de mGH secretada após a administração de HI e do plasmídeo pUC-UBI-mGH ou solução salina. Os níveis de mGH no soro dos camundongos que receberam 20 U de HI foram maiores (1,6 ± 0,4 ng/mL) que os do grupo controle sem administração da enzima, entretanto a diferença entre todos os grupos não foi significativa. O grupo cuja dose de hialuronidase foi 10 U apresentou uma concentração de 1,7 ± 0,5 ng/mL, 1,5 ± 0,5; 2,0 ± 1,2 e 1,6 ± 0,5 ng/mL para os grupos com concentrações de 30, 40 e 20U administradas nos dois músculos tibial respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou 0,8 ng/mL. Com base nesses resultados, decidiu-se continuar com a administração de 20 U HI/animal.

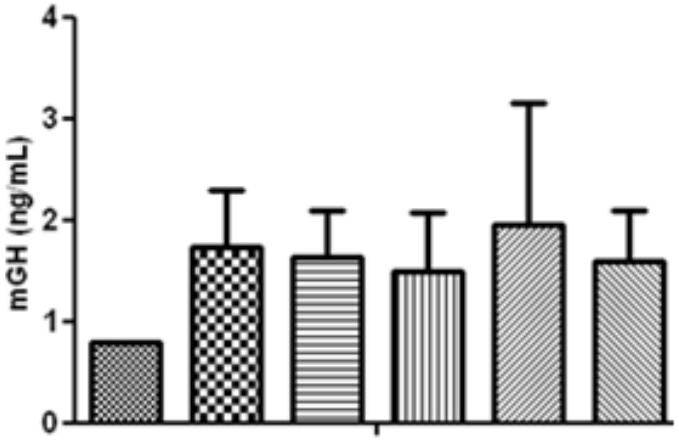

Figura 7: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit*, após administração de diferentes quantidades de hialuronidase no músculo tibial anterior e eletrotransferência do plasmídeo pUC-UBI-mGH na condição HV/LV. (▩) Sem HI, (▩) 10 U, (▩) 20 U, (▩) 30 U, (▩) 40 U, (▩) 20 U nos dois tibialis. (n=3 animais/condição).

5.4 Determinação da quantidade de DNA administrada

Para determinar a quantidade ideal de DNA a ser administrada no músculo, foram utilizadas doses diferentes do plasmídeo e a concentração de mGH no soro dos camundongos *lit/lit* foi determinada. O grupo administrado com 25 µg DNA apresentou 0,02 ng/µL, enquanto os grupos com 50, 75 e 100 µg DNA apresentaram concentrações de 1,6 ± 0,4; 1,8 ± 1,8 e 3,2 ± 2,3 ng/mL, respectivamente. A diferença entre os grupos não foi significativa, além de um alto desvio padrão para os dois últimos grupos, conforme é mostrado na Figura 8.

A partir desses resultados, foi decidido continuar com a administração de 50 µg DNA/animal, considerando uma melhor relação custo/benefício. Porém, uma repadronização da quantidade de DNA foi realizada e os resultados estão no item 5.9.

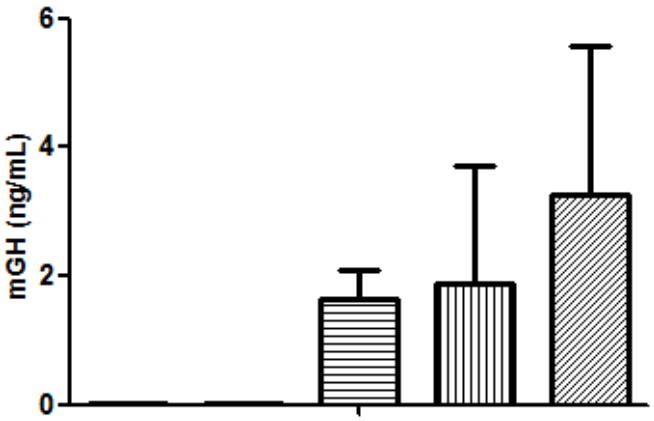

Figura 8: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit,* após administração de diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-mGH no músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência HV/LV. (▩) Salina, (▩) 25 µg, (▤) 50 µg, (▥) 75 µg e (▨) 100 µg. (n=3 animais/condição).

5.5 Determinação do volume ideal de solução de DNA administrado no músculo TA

Visto que o hGH possui uma melhor precisão de determinação no soro por não sofrer interferência do GH endógeno (mGH) nos imunoensaios, passamos a realizar experimentos com camundongos *lit/scid* injetados com o plasmídeo que possui o gene do hGH. Para padronizar um volume ideal do plasmídeo administrado no TA, foi realizado um teste com 20 e 10 µL da solução de DNA. Neste experimento foi também utilizada outra condição de eletrotransferência com 375 V/cm que, segundo verificado por Fewell et al. (2001) e Nicol et al. (2002), é capaz de promover um alto nível de expressão gênica.

Conforme é verificado na Figura 9, o grupo cujo parâmetro de eletrotransferência foi 375 V/cm e 20 µL de DNA apresentou uma concentração da proteína no soro de 4,3 ± 2,3 ng/mL, valor significativamente maior (P<0,01) que todos os outros grupos, que apresentaram 1,6 ± 0,9; 1,5 ± 0,6 e 0,7 ± 0,1 ng/mL para 375 V/cm e 10 µL, HV/LV e 20 µL e salina, respectivamente. A partir desses resultados optamos por continuar administrando 20 µL de volume de DNA no TA e alterar para a eletrotransferência com 375 V/cm.

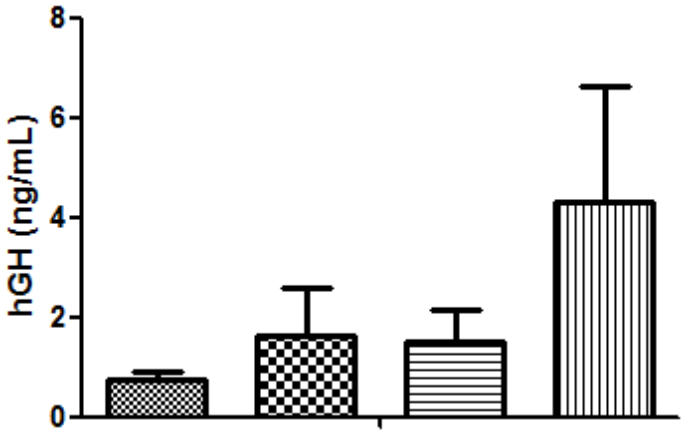

Figura 9: Concentração de hGH no soro de camundongos *lit/scid,* após administração de diferentes volumes de DNA no músculo tibial anterior e eletrotransferência de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH. (▩) Salina, (▩) 10 µL de DNA e 375V/cm, (▤) 20 µL de DNA e HV/LV (▥) 20 µL de DNA e 375 V/cm. (n = 3 animais/condição).

5.6 Determinação da expressão de hGH utilizando o poli-L-glutamato

Buscando uma maior expressão de GH, foi realizado um experimento no qual o DNA foi diluído em solução salina acrescida de 6 mg/mL de poli-L-glutamato. Os camundongos *lit/scid* foram injetados com 20 µL do plasmídeo pUC-UBI-hGH (50 µg) e submetidos a diferentes condições de eletrotransferência (Figura 10).

Quando utilizada a eletrotransferência com 375 V/cm de 25 ms e 0,5 s de intervalo, o grupo com poli-L-glutamato apresentou uma concentração de hGH no soro de 3,6 ± 1,6 ng/mL, porém não foi maior que o valor de 4,3 ± 2,3 ng/mL obtido para o grupo sem a adição do polímero.

Com a eletrotransferência HV/LV, foram obtidas concentrações bem inferiores de hGH no soro para os dois grupos: 1,3 ± 0,4 e 1,5 ± 0,6 ng/mL com e sem o uso do poli-L-glutamato, respectivamente, novamente não havendo um aumento de expressão proteica.

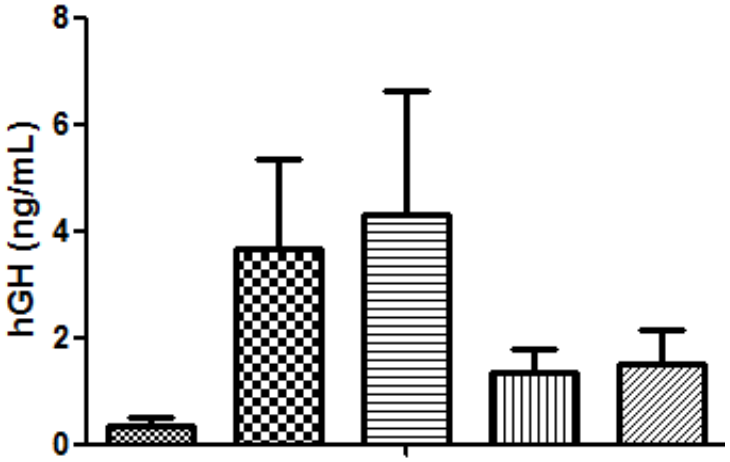

Figura 10: Concentração de hGH no soro de camundongos *lit/scid* , após administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH diluído em solução salina acrescida ou não de poli-L-glutamato, no músculo tibial anterior seguida de eletrotransferência. (▩) Salina, (▩) 375 V/cm com poli-L-glutamato, (▭) 375 V/cm sem poli-L-glutamato, (▥) HV/LV com poli-L-glutamato, (▨) HV/LV sem poli-L-glutamato. (n=3 animais/condição).

5.7 Determinação da expressão de mGH utilizando o poli-L-glutamato

Um ensaio comparando as diferentes condições de eletrotransferência (HV/LV e 375 V/cm) e utilizando o poli-L-glutamato foi também realizado em camundongos *lit/lit*, injetados com o plasmídeo contendo o gene do mGH, para confirmar os resultados do experimento anterior.

Como mostrado na Figura 11, o grupo HV/LV apresentou uma concentração de 2,3 ± 0,8 ng mGH/mL, e quando houve a combinação desse parâmetro com o polímero, a concentração foi de 2,7 ± 1,7 ng/mL. Utilizando o parâmetro de 375 V/cm foi possível atingir a concentração de 2,9 ± 0,9 ng/mL, enquanto com o poli-L-glutamato a concentração foi de 1,3 ± 0,5 ng/mL, sem apresentar uma diferença significativa.

Com base nesses resultados, optamos por manter a utilização da eletrotransferência 375 V/cm, sem a adição do poli-L-glutamato.

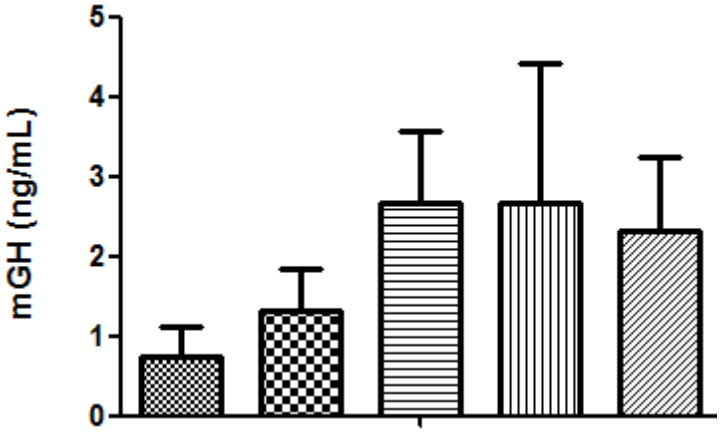

Figura 11: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit,* após administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH diluído em solução salina acrescida ou não de poli-L-glutamato , no músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência. (▩) Salina, (▦) 375 V/cm com poli-L- glutamato, (▤) 375 V/cm sem poli-L-glutamato, (▥) HV/LV com poli-L-glutamato, (▨) HV/LV sem poli-L-glutamato. (n=3 animais/condição).

5.8 Padronização da quantidade de pulsos utilizados para eletrotransferência

Foi realizado um experimento para avaliar diferentes quantidades de pulsos de 375 V/cm para eletrotransferência. Observamos que um único pulso, que vinha sendo utilizado nos ensaios, proporcionou um nível de expressão de mGH de 0,6 ± 0,2 ng/mL, enquanto quando utilizados dois pulsos obtivemos 2,9 ± 2,5 ng/mL; a condição de três pulsos forneceu 3,2 ± 0,8 ng/mL (Figura 12). Apesar do aumento de expressão proteica para as duas últimas condições analisadas, devido ao elevado desvio padrão não houve diferença estatística entre os grupos.

A partir desses resultados optamos por utilizar três pulsos de 375 V/cm, pois esta condição apresentou menor variabilidade de resposta em relação à utilização de 2 pulsos e não pareceu causar desconforto aos animais.

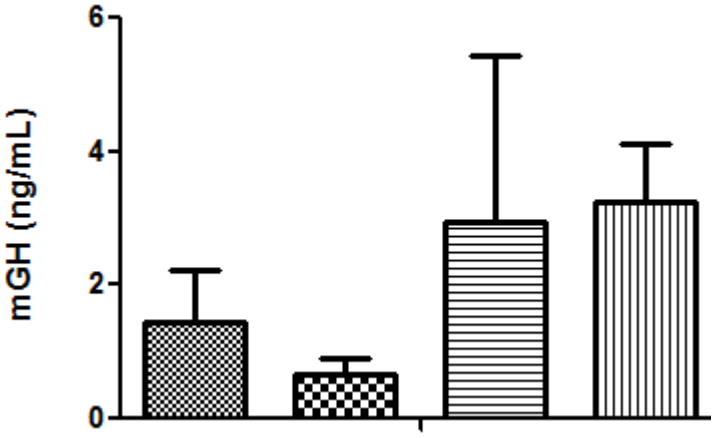

Figura 12: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit*, após administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH no músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência com 375 V/cm. ( ) Salina, ( )1 pulso, ( ) 2 pulsos, ( ) 3 pulsos. (n=3 animal/condição).

5.9 Repadronização da quantidade de DNA administrada

Foi realizado um novo ensaio com administração de 50, 75 e 100 µg de DNA, seguida de três pulsos de 375 V/cm, para confirmar a dose utilizada anteriormente (50 µg) e a presença do efeito de saturação. Conforme verificamos na Figura 13, o grupo em que foram administrados 50 µg de DNA apresentou uma concentração de 5,2 ± 3,4 ng/mL de mGH no soro, enquanto os grupos 75 e 100 µg, apresentaram 3,1 ± 0,8 e 3,9 ± 4,1, respectivamente e o grupo controle apresentou 0,5 ± 0,2 ng/mL. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com DNA, mas foi possível confirmar que há uma redução/estabilização na expressão da proteína de interesse quando são administradas doses superiores a 50 µg, um efeito já observado previamente por nós (Oliveira et al., 2010). Dessa forma, foi decidido continuar com a administração de 50 µg DNA/animal.

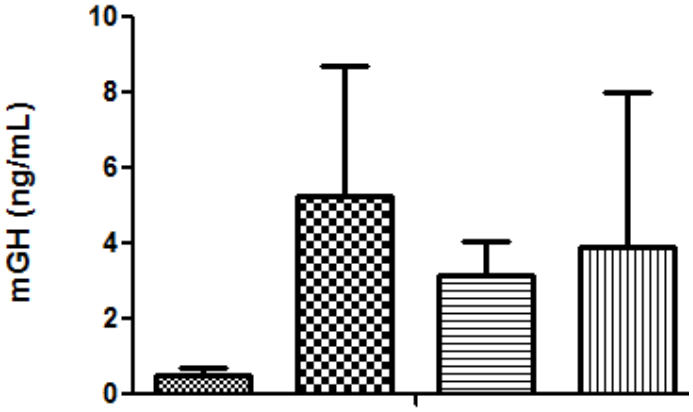

Figura 13: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit*, após administração de diferentes quantidades do plasmídeo pUC-UBI-mGH no músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência com 3 pulsos de 375 V/cm. (▩) Salina, (▩) 50 µg, (▤) 75 µg, (▥) 100 µg. (n=3 animais/condição).

5.10 Padronização do local e número de injeções em camundongos *lit/lit*

Visando obter uma maior expressão da proteína estudada, foi testada a administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH em diferentes locais do músculo tibial anterior. O grupo que recebeu duas injeções de 50 µg/20 µL do plasmídeo no mesmo músculo apresentou níveis de expressão de 5,9 ± 2,7 ng/mL, enquanto o grupo que recebeu duas injeções em cada músculo apresentou 14,7 ± 3,7 ng/mL, valor significativamente maior (P<0,001) que a do grupo anterior e do controle que foi de 0,5 ± 0,2 ng/mL (Figura 14).

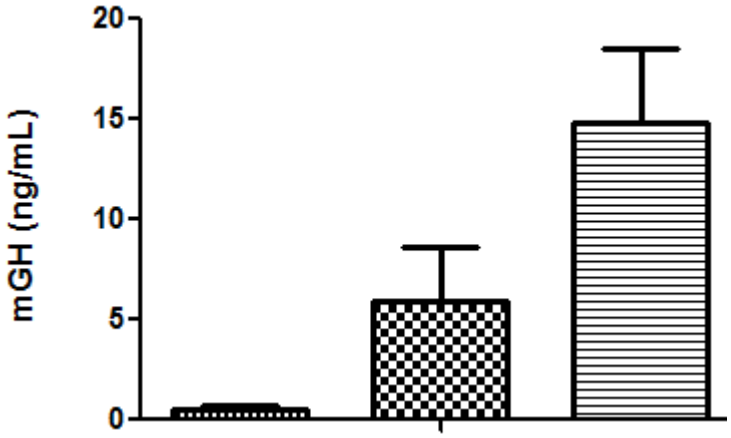

Figura 14: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit*, após administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH em diferentes locais do músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência com 3 pulsos de 375 V/cm. ( ) Salina, ( ) 2 injeções no mesmo TA, ( ) 2 injeções em cada TA. (n=3 animais/condição)

5.11 Comparação das medidas de comprimento dos fêmures por paquímetro e radiografia

Para avaliar o crescimento dos fêmures dos camundongos *lit/scid* utilizando um paquímetro digital ou radiografia, um experimento de 28 dias foi realizado administrando-se o plasmídeo pUC-UBI-hGH no músculo TA desses animais. Comparou-se o comprimento dos fêmures dos animais no início e final do ensaio por radiografia e no final as medidas foram realizadas também com um paquímetro digital, após eutanásia dos animais e dissecção dos fêmures. Na Tabela 2 são mostrados os valores médios dos fêmures direito e esquerdo dos grupos que foram injetados com o plasmídeo ou solução salina.

Com o paquímetro digital, o comprimento apresentado para o grupo em que foi administrada solução salina foi de 10,05 ± 0,85 mm, enquanto o grupo DNA apresentou 10,75 ± 0,61 mm, com um incremento não significativo de 7,0% para o fêmur direito. Para o fêmur esquerdo, os grupos salina e DNA apresentaram 9,85 ± 0,63 e 9,88 ± 0,66 mm, respectivamente, com 0,3% de incremento, sem também apresentar aumento significativo.

Quando os animais foram submetidos à radiografia, foi possível calcular o incremento do comprimento a partir das medidas realizadas no mesmo animal, antes e depois do experimento. O grupo salina apresentou um incremento de 5,5% para o fêmur direito e 4,1% para o esquerdo, não apresentando aumentos significativos; enquanto o grupo DNA apresentou para o fêmur direito 19,4% e para o esquerdo 12,3%, sendo ambos incrementos altamente significativos ($P<0,0001$).

Estes resultados mostram que a técnica de radiografia é mais eficiente, uma vez que é possível realizar as medidas inicial e final em um mesmo animal, anulando possivelmente um alto percentual de erro quando se compara com animais diferentes.

Tabela 2: Medida dos comprimentos dos fêmures de camundongos *lit/scid* por radiografia e paquímetro digital, antes e após injeção de DNA plasmidial no músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência.

		Paquímetro digital			
	n	Antes	Depois	Incremento (%)[1]	Significância [1]
Fêmur direito (mm)					
Salina	10	___	10,05 ± 0,85	___	
DNA	8	___	10,75 ± 0,61	7,0	n.s.
Fêmur esquerdo (mm)					
Salina	10	___	9,85 ± 0,63	___	
DNA	8	___	9,88 ± 0,66	0,3	n.s.

		Radiografia			
	n	Antes	Depois	Incremento (%)[2]	Significância[2]
Fêmur direito (mm)					
Salina	10	8,47 ± 0,45	8,94 ± 0,66	5,6	n.s.
DNA	10	8,39 ± 0,41	10,02 ± 0,84	19,4	P<0,001
Fêmur esquerdo (mm)					
Salina	10	8,35 ± 0,70	8,69 ± 0,46	4,1	n.s.
DNA	10	8,18 ± 0,44	9,19 ± 0,46	12,3	P<0,001

[1] DNA final vs. salina (em animais diferentes); [2]Condição final vs. condição inicial (no mesmo animal)

5.12 Bioensaio para avaliação dos parâmetros de crescimento após a administração de DNA plasmidial no músculo tibial anterior de camundongos *lit/lit*

Para testar todas as condições estudadas e otimizadas até o momento, foi realizado um bioensaio com camundongos *lit/lit* e administração do plasmídeo contendo o gene do mGH. Os animais receberam duas injeções desse plasmídeo em cada TA e foram acompanhados e pesados durante 36 dias.

Na Figura 15 é mostrada a variação do peso desses animais durante todo o ensaio. Podemos observar que o grupo que recebeu a injeção com o plasmídeo apresentou uma variação de peso maior em relação ao grupo em que foi administrada salina e também em relação ao grupo heterozigoto não tratado. As equações das curvas de crescimento foram para o grupo DNA: $Y= - 0,3897 + 0,2256X - 0,0028x10^{-3}X^2$ ($R^2= 0,9808$); para o grupo salina: $Y= - 0,4322 + 0,0451X - 0,0004x10^{-3}X^2$ ($R^2= 0,7940$); e para o grupo de animais heterozigotos: $Y= - 0,0535 + 0,1195X - 0,0004x10^{-3}X^2$ ($R^2=0,9810$). A curva dos animais tratados apresentou uma diferença altamente significativa ($P< 0,0001$) em relação à curva dos controles.

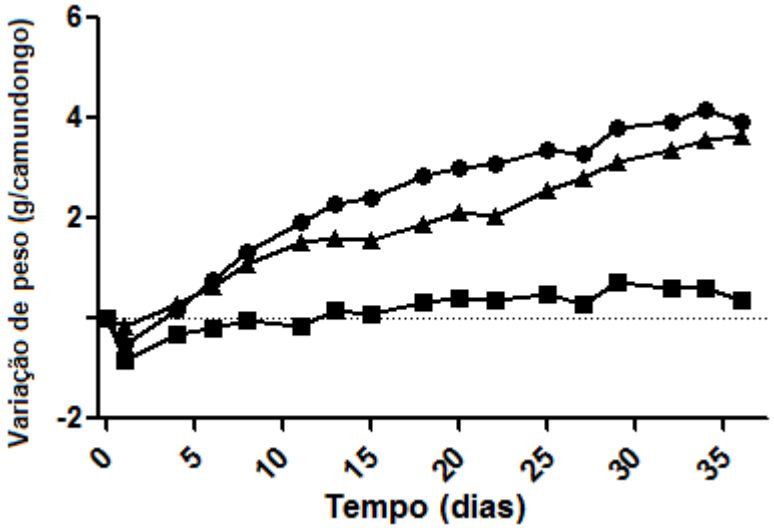

Figura 15: Variação de peso de camundongos *lit/lit,* após administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH em dois locais de cada músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência com 3 pulsos de 375 V/cm. (■) Salina, n=5; (▲) animais heterozigotos sem tratamento, n=4; (●) DNA, n=7.

Os níveis de mGH no soro desses animais foram determinados no final do experimento, conforme é mostrado na Figura 16. O grupo tratado apresentou uma concentração da proteína de interesse de 8,5 ± 2,3 ng/mL, significativamente maior (P<0,0002) em relação ao grupo salina que apresentou 1,7 ± 1,9 ng/mL, assim como foi também superior (P<0,0002) quando comparado com o grupo de animais heterozigotos não tratados (4,5 ± 1,5 ng/mL).

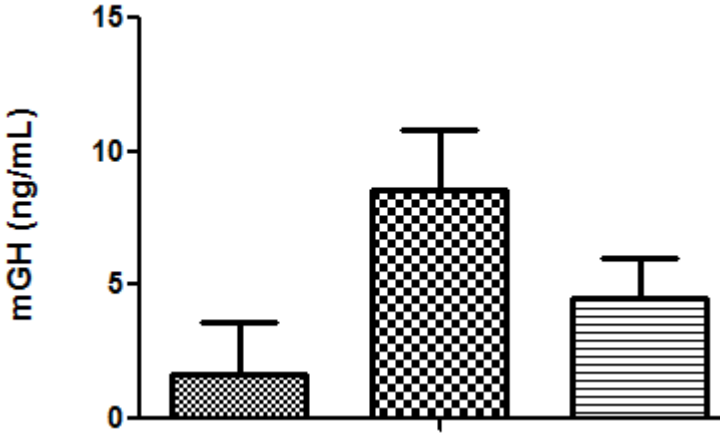

Figura 16: Concentração de mGH no soro de camundongos *lit/lit,* após 36 dias da administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH em dois locais de cada músculo tibial anterior, seguida de eletrotransferência com 3 pulsos de 375 V/cm. (▩) Salina, n= 5; (▩) DNA, n= 7; (▤) heterozigotos, n= 4.

Foram também avaliados alguns parâmetros que estão diretamente relacionados ao crescimento longitudinal, antes e depois da administração do plasmídeo para determinar o percentual de crescimento e o *catch-up growth*. Na Tabela 3 observamos que para todos os parâmetros avaliados, o grupo tratado apresentou um percentual de incremento altamente significativo em relação ao grupo controle (salina), com $P<0,001$ para o peso corpóreo e $P<0,002$ para o comprimento do corpo, da cauda e para ambos os fêmures. O grupo com animais heterozigotos também apresentou diferença significativa em relação à salina, porém esta diferença foi inferior à do grupo tratado: $P<0,05$ para o peso do corpo, comprimento da cauda e fêmur esquerdo e $P<0,02$ para comprimento total do corpo e fêmur direito. As porcentagens de recuperação de crescimento dos camundongos *lit/scid* tratados em relação aos camundongos heterozigotos de mesma idade (*catch-up growth*) para o peso corpóreo, comprimento da cauda, do corpo, dos fêmures direito e esquerdo foram de: 69,2 ± 19,5; 39,7 ± 14,8; 45,4 ± 14,3; 86,4 ± 21,6 e 71,4 ± 25,3, respectivamente.

Tabela 3: Parâmetros de crescimento determinados antes e após 36 dias da administração de duas injeções de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH em cada músculo tibial anterior de camundongos *lit/lit*.

Parâmetro de crescimento	n	Antes do tratamento	Final do tratamento	Incremento (%) [1]	Significância [1]	*Catch-up* (%)
Peso corpóreo (g)						
pUC-UBI-mGH	7	10,63 ± 0,96	14,81 ± 1,25	39,3	P<0,001	69,2 ± 19,5
Heterozigotos	4	16,64 ± 1,82	20,22 ± 1,94	21,5	P<0,05	
Salina	5	10,46 ± 0,55	11,07 ± 0,76	5,8	n.s.	
Comprimento da cauda (cm)						
pUC-UBI-mGH	7	6,53 ± 0,13	7,18 ± 0,33	9,9	P<0,002	39,7 ± 14,8
Heterozigotos	4	6,95 ± 0,13	7,78 ± 0,32	11,9	P<0,05	
Salina	5	6,68 ± 0,20	6,96 ± 0,18	4,2	P<0,05	
Comprimento total do corpo (cm)						
pUC-UBI-mGH	7	13,19 ± 0,45	14,54 ± 0,50	10,2	P<0,002	45,4 ± 14,3
Heterozigotos	4	14,55 ± 0,39	15,8 ± 0,74	8,6	P<0,02	
Salina	5	13,18 ± 0,36	13,76 ± 0,24	4,4	P<0,02	
Comprimento do fêmur direito (mm)						
pUC-UBI-mGH	7	0,94 ± 0,03	12,5 ± 0,05	32,9	P<0,002	86,4 ± 21,6
Heterozigotos	4	1,08 ± 0,09	12,9 ± 0,11	19,4	P<0,02	
Salina	5	1,00 ± 0,05	10,6 ± 0,04	6,0	n.s.	
Comprimento do fêmur esquerdo (mm)						
pUC-UBI-mGH	7	1,00 ± 0,08	12,4 ± 0,06	24,0	P<0,002	71,4 ± 25,3
Heterozigotos	4	1,11 ± 0,07	13,0 ± 0,12	17,1	P<0,05	
Salina	5	1,01 ± 0,07	10,4 ± 0,04	2,9	n.s.	

[1]Condição final vs. condição inicial

A concentração de mIGF-I secretada após a administração do plasmídeo pUC-UBI-mGH ou salina é apresentada na Tabela 4. O grupo que recebeu a injeção com o plasmídeo apresentou uma concentração da proteína de interesse superior à apresentada pelo grupo controle (salina), contudo, não houve diferença significativa.

Os músculos tibial anterior e quadríceps direito e esquerdo foram removidos e pesados visando avaliar os efeitos autócrinos/parácrinos e endócrinos do GH. Verificamos que para o grupo DNA, o músculo quadríceps direito apresentou um percentual de incremento de peso de 31,4 % e o esquerdo um incremento de peso de 29,4%, somente para o direito foi observada uma diferença significativa ($P<0,01$), em relação ao grupo controle (salina). Os músculos tibial anterior direito e esquerdo apresentaram 27,2 e 38,1% de incremento de peso para o grupo DNA, respectivamente, estatisticamente significativo somente para o tibial esquerdo ($P< 0,005$). O grupo tratado com mGH apresentou porcentagens de recuperação (*catch-up*) em relação aos camundongos heterozigotos de idade correspondente de 9,8 ± 5,1 para o mIGF-I; 45,7 ± 51,6 e 69,2 ± 37,7 para o tibial anterior direito e esquerdo, respectivamente; 31,0 ± 20,5 para o quadríceps direito e 27,5 ± 29,3 para o quadríceps esquerdo.

Tabela 4: Concentração de mIGF-I no soro de camundongos *lit/lit* e peso dos músculos tibial anterior e quadríceps, após a administração de duas injeções de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH ou salina nos músculos tibiais anteriores direito e esquerdo, seguida de eletrotransferência

Parâmetro de Crescimento	n	Final do tratamento	Incremento (%) [1]	Significância [1]	*Catch-up* (%)
mIGF-I (ng/mL)					
pUC-UBI-mGH	7	71,2 ± 16,9	49,2	n.s.	9,8 ± 5,1
Heterozigotos	4	325,0 ± 142,0	81,3	P<0,005	
Salina	5	47,7 ± 33,5	—	—	
Peso tibial anterior D (mg)					
pUC-UBI-mGH	7	0,28 ± 0,09	27,2	n.s.	45,7 ± 51,6
Heterozigotos	4	0,37 ± 0,09	68,2	P<0,02	
Salina	5	0,22 ± 0,05	—	—	
Peso tibial anterior E (mg)					
pUC-UBI-mGH	7	0,29 ± 0,05	38,1	P<0,005	69,2 ± 37,7
Heterozigotos	4	0,34 ± 0,06	61,9	P<0,005	
Salina	5	0,21 ± 0,03	—	—	
Peso quadríceps D (mg)					
pUC-UBI-mGH	7	0,67 ± 0,11	31,4	P<0,01	31,0 ± 20,5
Heterozigotos	4	1,04 ± 0,08	103,9	P<0,002	
Salina	5	0,51 ± 0,07	—	—	
Peso quadríceps E (mg)					
pUC-UBI-mGH	7	0,66 ± 0,15	29,4	n.s.	27,4 ± 29,3
Heterozigotos	4	0,92 ± 0,12	80,4	P<0,002	
Salina	5	0,51 ± 0,09	—	—	

[1] Grupo tratado ou heterozigoto em relação ao grupo salina.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram propostas estratégias com o intuito de padronizar uma metodologia de eletrotransferência eficiente, que permitisse atingir a máxima recuperação de crescimento de camundongos anões *lit/lit* ou *lit/scid*, em relação ao camundongo de tamanho normal (*catch-up growth*).

Uma etapa preliminar necessária para o desenvolvimento do estudo foi a genotipagem dos camundongos anões. A identificação da mutação *little* por meio do teste de genotipagem foi de extrema importância para a realização dos estudos com os animais, uma vez que o cruzamento aleatório (apenas observando o fenótipo) não estava sendo satisfatório para obtenção de animais adequados para experimentação. Somente após essa padronização foi possível obter camundongos anões para a manutenção da colônia e para a realização dos experimentos.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, a administração do DNA plasmidial foi realizada no músculo quadríceps exposto de camundongos *lit/lit* ou *lit/scid*, utilizando o gene do hGH ou do mGH (Oliveira et al., 2010; Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014). Neste trabalho foi realizada uma comparação entre a utilização do músculo quadríceps exposto e o tibial anterior não exposto, utilizando também duas condições de eletrotransferência: 8 pulsos de 150 V/cm e 20 ms, com intervalo de 0,5s (utilizada nos trabalhos prévios) ou 1 pulso de 800 V/cm e 100 µs e 1 pulso de 10 V/cm e 400 ms, denominada HV/LV. Utilizando o tibial anterior sem exposição e a nova metodologia de eletrotransferência (HV/LV) foi possível obter níveis de expressão de mGH significativamente superiores ($P<0,03$) aos obtidos pelo grupo quadríceps com exposição. A utilização do músculo tibial não exposto, além de obviamente ser uma técnica menos agressiva, mais prática e segura, foi relatada como sendo mais efetiva na incorporação do plasmídeo, principalmente quando combinada a um pulso curto e de alta voltagem, seguido por um pulso longo e de baixa voltagem, ou seja, a condição de eletrotransferência HV/LV (Bureau et al., 2000; Satkouskas et al. 2002; Hojman et al., 2007).

Os resultados obtidos na determinação do tempo de exposição da enzima hialuronidase (HI) estão de acordo com os apresentados por Mennuni et al. (2002), que também observaram que independentemente do tempo de exposição à enzima, há um aumento na expressão da proteína de interesse. Porém em relação à quantidade de HI, os resultados divergem, pois neste mesmo trabalho foi relatado

que a partir de 36 U de HI havia um aumento na expressão de eritropoietina, enquanto não observamos diferença significativa nos níveis de expressão quando variamos as doses entre 10 e 40 U da enzima.

No presente trabalho, o primeiro ensaio para determinar a quantidade de DNA administrada no músculo, mostrou que quanto mais DNA administrado, mais elevada a expressão da proteína de interesse e estes resultados estão de acordo com os obtidos por Wang et al. (2005). Por outro lado, em nosso grupo (Oliveira et al., 2010) foi observada uma diminuição da expressão proteica em doses acima de 50 µg de plasmídeo administrado no quadríceps de camundongos *lit/scid*, provavelmente devido a um efeito de saturação, que também já havia sido relatado por Golzio et al. (2004) e Fattori et al. (2005). Isso se confirmou em um segundo ensaio, no qual a administração de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-mGH, seguida de eletrotransferência, em camundongos *lit/lit*, resultou em uma expressão de 5,2 ± 3,4 ng/mL de mGH, superior às doses de 75 µg (3,1 ± 0,8 ng/mL) e 100 µg (3,9 ± 4,1 ng/mL).

Em um experimento subsequente, foram utilizados outros parâmetros de eletrotransferência (1 pulso de 375 V/cm de 25 ms e 0,5 s de intervalo), comparando com a HV/LV, uma vez que na literatura esta condição é descrita como sendo eficiente para a obtenção de altos níveis de expressão da proteína de interesse (Fewell et al., 2001; Nicol et al., 2002). Neste mesmo ensaio foram também utilizados diferentes volumes de solução do DNA (10 e 20 µL), administrados no músculo TA. Além disso, camundongos *lit/scid* foram injetados com o plasmídeo pUC-UBI-hGH, uma vez que para determinar o hGH, não há interferência do GH endógeno. De acordo com os resultados, a combinação de 20 µL com 375 V/cm foi mais eficiente ($P<0,01$) quando comparada com os outros parâmetros estudados. Embora a condição HV/LV venha sendo descrita em diversos trabalhos como sendo efetiva na absorção do plasmídeo pelas células musculares do tibial anterior (Bureau et al., 2000; Satkauskas et al., 2002; Hojman et al., 2007), os resultados com 375 V/cm estão de acordo com outros autores que mostraram que esta condição de eletrotransferência proporcionou níveis de expressão elevados de eritropoietina (Fewell et al., 2001; Nicol et al., 2002). O volume utilizado confirma os estudos apresentados por Higuti (2016), mostrando que a diminuição do volume foi vantajosa de 50 para 20 µL, mas que não forneceu aumento satisfatório quando foi de 20 µL para 10 µL. Wang et al. (2005) também observaram o mesmo tipo de efeito, ou seja,

a diminuição do volume de solução do plasmídeo injetado, forneceu menores níveis de expressão de leptina no soro de camundongos diabéticos.

Outra tentativa de aumento da expressão de GH *in vivo*, foi a adição do polímero poli-L-glutamato à solução do DNA plasmidial. Utilizando a eletrotransferência de 1 pulso de 375 V/cm, o grupo com a adição deste polímero não apresentou níveis de hGH no soro, superiores às obtidas pelo grupo sem o poli-L-glutamato. Quando utilizada a eletrotransferência HV/LV, além das concentrações obtidas terem sido inferiores para ambos os grupos (com e sem o polímero), não houve também aumento com a adição do polímero. Contudo, na literatura foram encontrados aumentos de 2 a 12 vezes para a expressão da enzima SEAP (*secreted embryomic alkaline phosphatase*) e da eritropoietina, com a utilização do poli-L-glutamato (Fewell et al., 2001; Nicol et al., 2002; Mc Mahon & Wells, 2004). Quando um experimento semelhante foi realizado, com a administração do plasmídeo contendo o gene do mGH e em camundongos *lit/lit*, não houve também diferença significativa para ambas as condições de eletrotransferência ou para os grupos com e sem o polímero. Dessa forma, optamos por continuar com 1 pulso de 375 V/cm, sem a adição do poli-L-glutamato.

Como em Nicol et al. (2002) haviam sido utilizados dois pulsos de 375 V/cm, decidimos realizar um ensaio para otimizar esse parâmetro, utilizando 1, 2 e 3 pulsos. O grupo em que se aplicou apenas 1 pulso, apresentou 0,6 ± 0,2 ng/mL de mGH, enquanto 2 e 3 pulsos apresentaram 2,9 ± 0,2 e 3,2 ± 0,8 ng/mL, respectivamente. A partir desses resultados optamos por utilizar 3 pulsos de 375 V/cm, pois esta condição apresentou menor variabilidade de resposta em relação à utilização de 2 pulsos e não pareceu causar maior desconforto aos animais.

A partir da confirmação de que a administração de grandes quantidades de DNA em apenas um local do músculo não aumenta a expressão da proteína de interesse, provavelmente devido a um efeito de saturação (Oliveira et al., 2010). Resolvemos administrar o plasmídeo em mais de um local no mesmo músculo ou nos dois músculos. Os resultados mostraram que duas injeções de 50 µg de DNA em cada TA forneceu níveis de expressão significativamente mais elevados da ordem de 2,5 vezes ($P<0,001$), quando comparada com a mesma quantidade injetada em apenas um dos músculos. Fattori et al. (2005) também descreveram um aumento na expressão de eritropoietina de até cerca de 25 vezes, quando realizadas três ou quatro injeções no tibial anterior de coelhos. Em outro trabalho

(Wang et al., 2005), foi verificado que a injeção da mesma quantidade do plasmídeo injetada em dois locais do músculo, proporcionou aumentos significativos nos níveis de expressão de leptina. Gardiner et al. (2006), em estudos com vacina de DNA buscando imunização, também obtiveram melhores resultados quando administraram o plasmídeo via intramuscular em mais de uma pata dos camundongos.

Neste trabalho foi também padronizada uma metodologia para determinação do comprimento dos fêmures, em que as medidas no mesmo animal foram feitas por radiografia, antes e depois do experimento. Isso possibilitou a redução de possíveis erros quando comparada com a medida por paquímetro digital, utilizada anteriormente pelo nosso grupo, que obviamente necessita do uso de animais diferentes (Higuti et al., 2012; Cecchi et al., 2014; Higuti et al., 20160). Com o paquímetro digital, o fêmur direito do grupo tratado apresentou um percentual de incremento de 7,0%, o fêmur esquerdo apresentou 0,3% de incremento e o grupo controle não apresentou um incremento significativo. Dessa forma, não houve diferença significativa para o incremento de ambos os fêmures, comparando com o grupo salina. Enquanto que para os mesmos animais submetidos à radiografia, os incrementos foram 12,3% e 19,4% para os fêmures direito e esquerdo do grupo tratado e para o grupo salina foram 5,6% para o fêmur direito e 4,1% para o esquerdo, sendo ambos altamente significativos em relação à condição inicial dos mesmos animais ($P<0,001$).

A partir da padronização dos parâmetros de eletrotransferência foi realizado um bioensaio de 36 dias, no qual camundongos *lit/lit* receberam duas injeções do pUC-UBI-mGH em cada músculo TA e foram submetidos a 3 pulsos de 375 V/cm e 25 ms e 0,5 s de intervalo, para avaliação de parâmetros de crescimento, principalmente os relacionados ao crescimento longitudinal.

Quanto à curva de variação de peso corpóreo, os camundongos tratados com DNA plasmidial apresentaram um comportamento semelhante aos dos camundongos heterozigotos sem tratamento e ambas as curvas apresentaram diferenças altamente significativas em relação à curva dos animais que receberam salina ($P<0,0001$). Após o ajuste das equações das curvas usando a função quadrática, observamos que as inclinações das curvas para os grupos tratado e heterozigoto foram 0,2256 e 0,1195 g/camundongo/dia, respectivamente. Se compararmos com as curvas de Higuti et al. (2016), no qual foi realizado o mesmo

tratamento estatístico, podemos notar que obtivemos um resultado similar, pois foi obtido neste trabalho uma inclinação de 0,2330 g/camundongo/dia, após 1 mês da administração de uma injeção em cada TA de 50 µg de pUC-UBI-hGH, em camundongo *lit/scid* de 80 dias de idade, utilizando a eletrotransferência HV/LV. Lembramos que no presente trabalho foram utilizados camundongos *lit/lit* com aproximadamente essa mesma idade.

Por outro lado, se avaliarmos em relação ao nosso modelo homólogo (Cecchi et al., 2014), no qual foi obtida uma inclinação de 0,130 g/camundongo/dia, após 1 mês da administração do DNA plasmidial, podemos considerar que houve uma melhora no desempenho da nossa estratégia de terapia gênica. Porém, devemos ressaltar que neste bioensaio os camundongos *lit/lit* receberam apenas uma injeção do pUC-UBI-mGH no músculo quadríceps exposto e nas condições antigas de eletrotransferência (8 pulsos de 150 V/cm, com duração de 20 ms e intervalo de 0,5 s entre os pulsos).

Ao analisarmos os níveis de mGH na circulação dos camundongos *lit/lit* ao final do bioensaio de 36 dias (8,5 ± 2,3 ng/mL), verificamos que são da ordem de 2 vezes mais elevadas que os obtidos anteriormente (Cecchi et al., 2014). Estes níveis podem ser considerados da mesma ordem dos valores mais elevados de hGH obtidos até o momento, que foram de ~ 6,7 ± 1,2 ng hGH/mL em camundongos *lit/scid* (Higuti et al., 2016). Enfatizamos que o modelo heterólogo tem apresentado resultados mais expressivos, mas que o homólogo é o mais interessante e real, quando se almeja o desenvolvimento futuro de protocolos clínicos.

Com relação aos parâmetros de crescimento longitudinal, podemos também afirmar que houve uma melhora significativa se compararmos, por exemplo, os valores de *catch-up growth*. No modelo homólogo descrito em Cecchi et al. (2014), foram obtidas recuperações da ordem de 20% para o peso corpóreo, os comprimentos da cauda, do total do corpo e dos fêmures. No trabalho de Higuti et al. (2016), ocorreu um aumento significativo dos valores de *catch-up,* de pelo menos duas vezes, atingindo os valores máximos da ordem de 77% para o comprimento dos fêmures, quando utilizados camundongos mais jovens (40 dias de idade). No presente trabalho, observamos que os valores de *catch-up* variaram de 40 a 70% para o peso e comprimento do corpo total e da cauda. Novamente a maior correção fenotípica foi obtida para o comprimento dos fêmures, com valores da ordem de

79%, confirmando o notável efeito osteogênico do GH, mesmo utilizando camundongos de aproximadamente 80 dias de idade.

Quanto à determinação do mIGF-I no soro dos camundongos *lit/lit* tratados com o gene do mGH, foram obtidos níveis mais elevados de até 1,5 vezes superiores em relação aos camundongos que receberam salina, porém sem diferença significativa e com alto desvio-padrão após 36 dias. Os camundongos anões tratados atingiram níveis inferiores (da ordem de 4,5 vezes) que os dos camundongos heterozigotos sem tratamento. Estes resultados são similares aos obtidos anteriormente utilizando o modelo homólogo (Cecchi et al., 2014), porém são inferiores aos obtidos por Higuti et al. (2016), que apresentaram, pela primeira vez, níveis de mIGF-I comparáveis aos dos camundongos normais sem tratamento após 15 dias da administração de DNA plasmidial, em camundongos *lit/scid* de 40 dias de idade.

A utilização de outras metodologias de transferência gênica já proporcionou uma completa normalização dos níveis de IGF-I e do peso corpóreo. Sondergaard et al. (2003) e Khamaisi et al. (2007), mediante injeção hidrodinâmica em camundongos hipofisectomizados, obtiveram valores de 400-600 ng IGF-I/mL, enquanto os dos grupos controles foram inferiores a 100 ng/mL. Correção fenotípica e normalização dos níveis de IGF-I foram também obtidos após administração de um vetor adenoviral na veia caudal de camundongos *lit/lit*, o grupo tratado apresentou 238 ng IGF-I/mL e o controle, 61 ng/mL (Hahn et al., 1996). Outros pesquisadores, Sagazio et al. (2008) e Martari et al. (2009), utilizaram um vetor adenoviral contendo o gene do mGH em um modelo de camundongo de deficiência isolada de GH (GHRHRO). O primeiro desses estudos, empregando a administração intraperitoneal, proporcionou uma normalização do peso corpóreo e dos níveis de IGF-I (400-600 ng/mL; controle = ~ 100 ng/mL), enquanto no segundo, mediante injeção no quadríceps, foi obtida apenas uma correção fenotípica parcial, com níveis de IGF-I da ordem de 50 ng/mL, não significativamente diferentes do grupo controle.

Na literatura é descrita uma correlação positiva entre a idade e os níveis de mIGF-I, como a encontrada em camundongos não deficientes de GH (*lit/*+), nos quais foram obtidos níveis de ~100 ng/mL em camundongos de uma semana e de ~550 ng/mL, após 8 semanas de idade (Donahue et al., 1993). Courtland et al. (2011) observaram que durante a fase puberal, que corresponde de 4 a 8 semanas em camundongos, as mudanças corporais e no comprimento dos ossos ocorrem

mais rapidamente. Este fato foi confirmado recentemente (Higuti et al., 2016), onde a resposta de todos os parâmetros de crescimento e dos níveis de mIGF-I foram mais pronunciadas em camundongos de 6 semanas (40 dias de idade), quando comparadas com os de ~12 semanas (80 dias de idade).

Portanto, podemos concluir que no presente trabalho foram obtidas melhoras significativas em nosso modelo homólogo de terapia gênica, principalmente em relação aos níveis de mGH e aos parâmetros de crescimento dos camundongos *lit/lit*. Acreditamos que o emprego de camundongos mais jovens, de aproximadamente 40 dias de idade, possa aumentar ainda mais as porcentagens de recuperação de crescimento e os níveis de mIGF-I, atingindo valores similares aos dos camundongos normais.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Após administração do DNA plasmidial no músculo tibial anterior não exposto, mediante diferentes condições de eletrotransferência (HV/LV ou 375 V/cm), foram obtidos altos níveis de expressão de mGH. Foi observado que a utilização deste músculo é eficiente, mais prática e menos invasiva em relação ao músculo quadríceps exposto.

- O tempo de exposição da enzima hialuronidase (HI) de 30 minutos proporcionou níveis séricos de mGH superiores aos dos outros tempos testados (15, 45 minutos). A dose de 20 U de HI foi escolhida para dar continuidade aos ensaios por não ter sido observado um aumento significativo de expressão de GH quando doses maiores foram utilizadas.

- A quantidade de 50 µg de DNA administrada no músculo TA proporcionou uma expressão de GH semelhante às outras doses (25, 75 e 100 µg), pois a diferença entre elas não foi significativa e por esta razão foi decidido manter esta dose que já era utilizada pelo grupo.

- A injeção de 20 µL de solução do plasmídeo pUC-UBI-hGH forneceu uma maior expressão de hGH no soro de camundongos *lit/scid,* quando comparada à administração de 10 µL de solução. A condição de eletrotransferência com 1 pulso de 375 V/cm mostrou-se mais eficiente em relação à HV/LV.

- Os estudos realizados com o poli-L-glutamato mostraram, no nosso caso, que o aumento de expressão proporcionado por este polímero não foi significativo, tanto para o hGH quanto para mGH.

- A utilização de 3 pulsos de 375 V/cm demonstrou ser eficiente no aumento da expressão da proteína de interesse, apesar de não ser diferente estatisticamente das outras condições testadas (1 e 2 pulsos).

- Aumentando o número de injeções no mesmo músculo tibial, foi possível aumentar significativamente os níveis de expressão de mGH. Isto confirma que há uma maior eficiência na expressão da proteína de interesse quando o DNA plasmidial é administrado em mais de um local no mesmo ou nos dois músculos.

- As medidas realizadas por radiografia apresentaram incrementos altamente significativos para ambos os fêmures dos animais injetados com DNA plasmidial, enquanto as com o paquímetro não apresentaram aumentos significativos.

- No bioensaio realizado com camundongos *lit/lit* para avaliar todas as condições otimizadas até o momento, obtivemos uma curva de variação de peso dos animais tratados com comportamento semelhante à dos camundongos heterozigotos e ambas as curvas apresentaram diferenças altamente significativas ($P<0,0001$) em relação à curva do grupo controle. Quando avaliamos os níveis de mGH, observamos uma manutenção de altos níveis de expressão até 36 dias após o tratamento, com diferença significativa ($P<0,002$) entre o grupo tratado e controle. Os parâmetros de crescimento avaliados e os níveis de mIGF-I também apresentaram aumentos expressivos, principalmente em relação aos valores de *catch-up* do comprimento dos fêmures.

- A utilização de camundongos mais jovens poderá proporcionar a completa normalização de crescimento pretendida com esta estratégia de terapia gênica não viral.

REFERÊNCIAS

ALATZOGLOU, K.S.; DATTANI, M. T. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency – an update. ***Nat. Rev. Endocrinol***., v. 6, p. 562-576, 2010.

ALATZOGLOU, K.S.; WEBB, E. A.; TISSIER, P. L.; DATTANI, M. T. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances. ***J. Rev. Endocrinol.***, v. 35, p. 376-432, 2014.

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.

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

BANK, P.; AHMED, S.F.; ARGENTE, J.; BACKELJAUW, P.; BETTENDORF, M.; BONA, G.; COUTANT, T.; ROSENFELD, R. G.; WALENKAMP, M. J.; SAVAGE, M. O. Identification and management of poor response to growth-promoting therapy in children with short-stature. ***Clin. Endocrinol.,*** v. 77, p. 169-181, 2012.

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.

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

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

BODLES-BRAKHOP, A.M.; HELLER, R.; DRAGHIA-AKLI, R. Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. ***Mol. Ther.***, v. 17, p. 585-92, 2009.

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

BUREAU, M.F.; GEHL, J.; DELEEUZE, V.; MIR, L. M.; SCHERMAN, D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. ***Biochim. Biophys. Acta***, v.1474, p. 353 – 359, 2000.

CÁZARES-DELGADILLO, J.; GANEM-RONDERO, A.; KALIA, Y. N. Human growth hormone: new delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. ***Eur. J. Pharm. Biopharm***., v. 2, p. 278- 88, 2011.

CECCHI, C.R. **Obtenção de um modelo homólogo de terapia gênica mediante administração direta de um plasmídeo com o gene do hormônio de crescimento murino em camundongos anões imunocompetentes**. São Paulo, USP. 2013.

CECCHI, C. R; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, N.A.J.; LIMA, E. R.; JACOBSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; AAGARD, L.; JORGE, A.A.L.; JENSEN, T.G.; 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.

COOK, D.M.; ROSE, S.R. A review of guidelines for use of growth hormone in pediatric and transition patients. ***Pituitary***; v. 15, p. 301-310, 2012.

CORREA-SILVA, S.R.; SÁ, L.B.; LENGYEL, A.M. Ghrelin and growth hormone secretagogues (GHS): modulation of growth hormone secretion and therapeutic applications. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metabol***., v. 52, p. 726-33, 2008.

COURTLAND, H.; SUN, H.; BETH-ON, M.; WU, Y.; ELIS, S.; ROSEN, C. J.; YAKAR, S. Growth hormone mediates puberal skeletal development independent of hepatic IGF-1 production. ***J. Bone Miner. Res***., v. 26, p. 761 – 768, 2011.

DAS, P.; MEYER, L.; SEYFERT, H. M.; BROCKMANN, G.; SCHWERIN, M. Structure of the growth hormone-encoding gene and its promoter in mice. ***Gene.*** v. 169, p. 209-213, 1996.

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

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

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

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

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

FATTORI, E.; CAPPELLETTI, M.; ZAMPAGLIONE, I.; MENNUNI, C.; CALVARUSO, F.; ARCURI, M.; RIZZUTO, G.; COSTA, P.; PERRETTA, G.; CILIBERTO, G.; LA MONICA, N. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. ***J. Gene Med.,*** v.7, p.228-36, 2005.

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

FEWELL, J. G.; MACLAUGHLIN, F.; MEHTA, V.; GONDO, M.; NICOL, F.; WILSON, E.; SMITH, L. C. Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroropation. ***Mol. Ther***., v. 3, p. 574-583, 2001.

GARDINER, D. F.; HUANG, Y.; BASU, S.; LEUNG, L.; SONG, Y.; CHEN, Z.; HO, D. D. Multiple-site DNA vaccination enhances immune responses in mice. ***Vaccine***, v. 24, p. 287-292, 2006.

GARLICK, J.A.; FENJVES, E.S. Keratinocyte gene transfer and gene therapy. ***Crit. Rev. Oral Biol. Med.,*** *v.* 7, p. 204-221, 1996.

GINN, S. L.; ALEXANDER, I. E.; EDELSTEIN, M. L.; ABEDI, M. R.; WIXON, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. ***J. Gene Med.***, v. 15, p. 65-77, 2013.

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

GOLZIO, M.; ROLS, M. P.; TEISSIÉ, J. In vitro in vivo electric fiel-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. ***Methods***, v. 33., p. 126 – 135, 2004.

GOTHELF, A.; GEHL, J. Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. ***Curr. Gene Ther.,*** v. 10, p. 287-99, 2010.

GOTHELF, A.; HOJMAN, P.; GEHL, J. Therapeutic levels of erythropoietin (EPO) achieved after gene electrotransfer to skin in mice. ***Gene Ther.***, v. 17, p. 1077-1084, 2010.

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

HARTMAN, M. L. Physiological regulators of growth hormone secretion. In growth hormone in adults – Physiological and clinical aspects, Cambridge University Press, 2000.

HIGUTI, E. **Correção fenotípica do nanismo avaliada por diferentes parâmetros de crescimento após administração de DNA plasmidial em modelo animal de deficiência isolada do hormônio de crescimento**. São Paulo, USP. 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.

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

HOJMAN, P.; ZIBERT, J. R.; GISSEL, H.; ERIKSEN, J.; GEHL, J. Gene expression profiles in skeletal muscle after gene electrotransfer. ***BMC Mol. Biol.,*** v. 8, p. 56, 2007.

HOJMAN, P.; SPANGGAARD, I.; OLSEN, C. H.; GEHL, J.; GISSEL, H. Calcium Electrotransfer for Termination of Transgene Expression in Muscle. ***Hum. Gene Ther.***, v.22, p.753-760, 2011.

KEMP, S. Growth hormone deficiency. ***eMedicine Specialties****.* Arkansas. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/923688-print>. Acesso em 06 Set. 2015.

KHAMAISI, M.; SONDERGAARD, M.; SEGEV, Y. 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.

KHAN, A. S.; DRAGHIA-AKLI, R.; SHYPAILO, R. J.; ELLIS, K. I.; MERSMANN, H.; FIOROTTO, M. L. A comparison of the growth responses following intramuscular GHRH plasmid administration versus daily growth hormone injections in young pigs. ***Mol***. ***Ther***., v. 18, p. 327 - 333, 2010.

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

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

MARTARI, M; SAGAZIO, A.; MOHAMADI, A.; NGUYEN, Q.; HAUSCHKA, S.D.; SALVATORI, R. Partial rescue of growth failure in growth hormone (GH)-deficient mice by a single injection of a double-stranded adeno-associated viral vector expressing the GH gene driven by a muscle-specific regulatory cassette. ***Hum. Gene Ther.***, v. 20, p. 759-766, 2009.

MCMAHON, J. M.; WELLS, D. J. Electroporation for gene transfer to skeletal muscles. ***Gene Ther.,*** v. 18, p. 156-159, 2004.

MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: Larsen, P. R., Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. ***Williams Textbook of Endocrinology*****,** Philadelphia, USA. p. 177-279, 2011.

MENNUNI, C.; CALVARUSO, F.; ZAMPAGLIONE, I.; RIZZUTO, G.; RINAUDO, D.; DAMMASSA, E.; CILIBERTO, G.; FATTORI, E.; LA MONICA, N. Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. ***Hum. Gene Ther.***, v. 13, p. 355- 365, 2002.

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

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

MOLITCH, M.E.; CLEMMONS, D.R.; MALOZOWSKI, S.; MERRIAN, G.R.; VANCE M.L. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. ***J. Clin. Endocrinol. Metab.,*** v. 96, p.1587-1609, 2011.

NAYEROSSADAT, N.; MAEDEH, T.; ALI, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. ***Adv. Biomed. Res.,*** v.1:27, p. 1 - 11, 2012.

NICOL, F.; WONG, M.; MACLAUGHLIN, F.C.; PERRARD, J.; NORDSTROM, J.L.; SMITH, L.C. Poly-L-glutamate, an anionic polymer, enhances transgene expression for plasmids delivery by intramuscular injection with in vivo eletroporation. ***Gene Ther.*** , v. 9, p. 1351-1358, 2002.

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

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.

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

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

PRUD´HOMME, G.J.; DRAGHIA-AKLI, R.; WANG, Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. ***Gene Ther.***, v. 14, p. 553-64, 2007.

PRUD'HOMME, G. J.; GLINKA, Y.; KHAN, A. S.DRAGHIA-AKLI, R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. ***Curr. Gene Ther.,*** v. 6, n. 2, p. 243-273, 2006.

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

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

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

ROCHA, M.G.; MARCHISOTTI, F.G.; OSÓRIO, M.G.; MARUI, S. High prevalence of pituitary magnetic resonance abnormalities and gene mutations in a cohort of Brazilian children with growth hormone deficiency and response to treatment. ***J. Pediatr. Endocrinol. Metab.,*** v 21, p. 673-680, 2008.

SAGAZIO, A.; XIAO, X.; WANG, Z.; MARTARI, M.; SALVATORI, R. A single injection of double-stranded adeno-associated viral vector expressing GH normalizes growth in GH-deficient mice. ***J. Endocrinol***., v. 196, p. 79 - 88, 2008.

SATKAUSKAS, S.; BUREAU, M. F.; PUC, M.; MAHFOUDI, A.; SCHERMAN, D.; MIKLAVCIC, D. Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. ***Mol. Ther***., v.5, p.133 - 140, 2002.

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

SHOJI, M.; KATAYAMA, K.,;TACHIBANA, M.; TOMITA, K.; SAKURAI, F.; KAWABATA, K.; MIZUGUCHI, H. Intramuscular DNA immunization with in vivo electroporation induces antigen-specific cellular and humoral immune responses in both systemic and gut-mucosal compartments. ***Vaccine***, v. 30, p. 7278-7285, 2013.

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

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

WANG, X.; TANG, J.; YANG, J.; LI, S.; JI, J.; GU, J. A comprehensive study of optimal conditions for naked plasmid DNA transfer into skeletal muscle by electroporation. ***Gene Med.***, v. 7, p. 1235-1245, 2005.

WANG, W.; LI, W.; MA, N.; Steinhoff, G. Non-viral gene delivery methods. **Curr. Pharm. Biotechnol**., v. 14, p. 46 - 60, 2013.

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