



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

**Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista
G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcção
para estudos por SPECT-CT em camundongos**

AMANDA PALERMO NUNES

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

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo
2023**

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

**Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista
G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcagem
para estudos por SPECT-CT em camundongos**

Versão Corrigida

AMANDA PALERMO NUNES

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

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo
2023**

Fonte de Financiamento: CAPES: 88887.627806/2021-00

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

Como citar:

NUNES, A. P. Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcção para estudos por SPECT-CT em camundongos. 2023. 129p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

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

Nunes, Amanda Palermo

Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcção para estudos por SPECT-CT em camundongos / Amanda Palermo Nunes; orientador Carlos Roberto Jorge Soares. -- São Paulo, 2023.
129 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. Hormônio de crescimento murino (mGH). 2. Antagonista G118R-mGH. 3. Receptor de GH (GHR). 4. Bioensaio. 5. SNC. I. Soares, Carlos Roberto Jorge, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Amanda Palermo Nunes

Título: Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcção para estudos por SPECT-CT em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pela oportunidade e acolhimento que me deu, de fazer parte do grupo de pesquisa de Hormônios, por acreditar no meu trabalho e potencial, e por todo o seu apoio acadêmico.

À Dra. Miriam Fussae Suzuki pelo auxílio, apoio técnico, direcionamento essenciais para o desenvolvimento do trabalho, e por toda experiência compartilhada.

À Dra. Cibele Nunes Peroni por tirar sempre minhas dúvidas, diálogos, e mostrar caminhos. Ao Dr. João Ezequiel de Oliveira e Antônio Carlos Junqueira que influenciaram com auxílio e suporte na execução do trabalho.

Ao meu amigo e pesquisador Filipe Menezes Bezerra pela amizade, motivação e apoio em todos os momentos, conversas e ensinamentos, além de realizar a indicação da minha entrada no grupo.

À pesquisadora Alissandra de Moura Gomes, pela amizade, motivação e apoio em todos os momentos de nossa formação acadêmica.

Aos pesquisadores Renan Passos Freire e Eliana Rosa Lima Filha por todo acolhimento, auxílio, apoio, suporte em momentos de dúvidas e experiência compartilhada.

Aos pesquisadores que influenciaram no desenvolvimento do trabalho, Dr. Paolo Bartolini, Dr. Patrick Jack Spencer, Dr. Daniel Perez Vieira.

Ao companheirismo de pesquisadores do centro de Biotecnologia, Vanessa Luna Yosidaki, Larissa Andrade Almeida, Stephanie Andrade Pomim, Valentina Andreatta Dutton, Mayelle Maria Paz Dias, Giovanna Dias.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial ao Centro de Biotecnologia (CEBIO), ao Biotério e ao Centro de Radiofarmácia (CECRF) do IPEN por proporcionar o espaço, suporte e os materiais necessários para a realização desse projeto.

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

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

À minha amada família e base, minha mãe Marcia Rita Palermo e à minha irmã Julia Palermo Nunes, por todo apoio e motivação em todos os contextos de minha vida, com eterno e profundo agradecimento.

À minha avó Pierina Destro Palermo e ao meu tio Francisco Palermo, por acreditarem em mim, e o apoio que sempre me deram.

Ao meu marido Renan Tadeu Marracho, que me acompanhou de perto, me apoiando e motivando, fazendo parte de toda caminhada.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo desse certo.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos”*
Friedrich Nietzsche

RESUMO

NUNES, A. P. **Síntese do hormônio de crescimento de camundongo e de seu antagonista G118R-mGH em células HEK293F cultivadas em suspensão e radiomarcção para estudos por SPECT-CT em camundongos.** 2023. 129p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo

Introdução: O hormônio de crescimento murino (mGH) é uma proteína de 21,8 kDa que consiste em 190 aminoácidos. Contém quatro resíduos de cisteína e duas ligações dissulfeto, semelhante ao hormônio de crescimento humano e aos de outros vertebrados. Para determinados estudos utilizando modelos animais murinos é preferível o uso espécie-específico do hormônio, para evitar a tolerância à exposição, desenvolvimento de respostas imunes e interação com outros receptores. Os camundongos *lit/lit* apresentam uma diminuição dos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fenótipo anão que podem ser revertidos com a aplicação do hormônio nos estágios iniciais do desenvolvimento do animal. A síntese inédita de um potencial antagonista de camundongo, G118R-mGH, com uma mutação no códon de glicina (G) no aminoácido 118, substituído por arginina (R), que permite que o sítio 1 se ligue ao receptor do hormônio do crescimento (GHR), mas impede a ligação funcional no sítio 2, inviabilizando a sinalização intracelular, pode contribuir para um maior entendimento da ação do GH no sistema nervoso. **Objetivo:** Obter mGH e G118R-mGH em células de rim de embrião humano (HEK293F), purificar e radiomarcicar a fim de investigar os efeitos fisiológicos da sua ação em camundongos. **Metodologia:** Esse trabalho foi dividido em cinco etapas: a síntese de DNA, com a construção do vetor pcDNA 3.4 TOPO, inserindo a sequência codificadora do hormônio mGH e de seu antagonista G118R-mGH, seguida da transformação de bactéria *Escherichia coli* para obter quantidade de plasmídeo suficiente para transfecção. Na segunda parte do trabalho, realizamos a expressão, por transfecção transiente, desses hormônios em cultura de células HEK293F em suspensão, avaliando o melhor dia de produção mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e western blotting. Na terceira etapa, realizamos a purificação utilizando as técnicas cromatográficas de troca iônica seguida de exclusão molecular. Na quarta etapa foi realizado o bioensaio em camundongos *lit/lit* com administração intraperitoneal de 10 µg/dia das proteínas com duração de 10 dias, e a análise com base na variação de massa corporal. A quinta e última etapa envolveu a radiomarcção do mGH e G118R-mGH com ¹³¹I e ¹²³I, seguida de ensaio *in vivo* de biodistribuição e SPECT-CT. **Resultados:** A produção em células de mamífero

apresentou níveis mais elevados de expressão das proteínas recombinantes no quarto dia de produção. O mGH e seu antagonista foram purificados e caracterizados por técnicas físico química (SDS-PAGE, WB, HPLC, MS). Foram produzidos cerca de 1 mg de proteína de interesse para cada 10 mL de cultura, com pureza superior a 90% e com concentração da ordem de 0,1 mg/mL. No bioensaio, o tratamento com mGH apresentou aumento da massa corporal, similar ao hGH usado como controle, enquanto o G118R-mGH, na mesma dose, não apresentou crescimento. A pureza do radiomarcado foi acima de 90% e no estudo com SPECT-CT ocorreu dispersão por todo o corpo de ambas as proteínas e principalmente em várias regiões cerebrais.

Conclusões: A produção e purificação do mGH e do G118R-mGH foram obtidas com êxito e os estudos com radiomarcção e dos estudos *in vivo* demonstraram uma diferença de atividade e biodistribuição, possivelmente relacionadas com diferenças nas ligações com o GHR, o que abre caminho para futuras pesquisas.

Palavras-chave: Antagonista G118R-mGH; Bioensaio; Hormônio de crescimento murino (mGH); Receptor de GH (GHR); SNC.

ABSTRACT

NUNES, A. P. **Synthesis of mouse growth hormone and its antagonist G118R-mGH in HEK293F cells cultured in suspension and radiolabeling for SPECT-CT studies in mice.** 2023. 129p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Introduction: Murine growth hormone (mGH) is a 21.8 kDa protein consisting of 190 amino acids. It contains four cysteine residues and two disulfide bonds, similar to human growth hormone and those of other vertebrates. For certain studies using murine animal models it is preferable the species-specific use of the hormone to avoid exposure tolerance, development of immune responses and interaction with other receptors. Lit/lit mice present a decrease in insulin-like growth factor levels (IGF-1) and dwarf phenotype that can be reversed with the application of the hormone in the early stages of animal development. The novel synthesis of a potential mouse antagonist, G118R-mGH, with a mutation in the codon of glycine (G) in amino acid 118, replaced by arginine (R), which allows site 1 to bind to the growth hormone receptor (GHR), but prevents functional binding at site 2, intracellular signaling, can contribute to a better understanding of the action of GH in the nervous system. **Objective:** To obtain mGH and G118R-mGH in human embryo kidney cells (HEK293F), purify and radiomark in order to investigate the physiological effects of its action in mice. **Methodology:** This work was divided into five stages: DNA synthesis, with the construction of the vector pcDNA 3.4 TOPO, inserting the coding sequence of the hormone mGH and its antagonist G118R-mGH, followed by the transformation of Escherichia coli bacteria to obtain enough plasmid for transfection. In the second part of the work, we performed the expression, by transient transfection, of these hormones in suspended HEK293F cell culture, evaluating the best production day by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and western blotting. In the third stage, we performed purification using ion exchange chromatographic techniques followed by molecular exclusion. In the fourth stage, the bioassay was performed in lit/lit mice with intraperitoneal administration of 10 µg/day of the proteins lasting 10 days, and the analysis based on body mass variation. The fifth and final stage involved the radiolabeling of mGH and G118R-mGH with ¹³¹I and ¹²³I, followed by in vivo

biodistribution and SPECT-CT assays. **Results:** Production in mammalian cells showed higher levels of expression of recombinant proteins on the fourth day of production. The mGH and its antagonist were purified and characterized by physical chemical techniques (SDS-PAGE, WB, HPLC, MS). About 1 mg of protein of interest was produced for each 10 mL of culture, with purity higher than 90% and concentration of around 0.1 mg/mL. In the bioassay, the treatment with mGH showed an increase in body mass, similar to hGH used as control, while G118R-mGH, at the same dose, did not show growth. The purity of the radiolabeled was above 90% and in the study with SPECT-CT there was dispersion throughout the body of both proteins and mainly in various brain regions. **Conclusions:** The production and purification of mGH and G118R-mGH were successfully obtained and the radiolabeling studies and in vivo studies demonstrated a difference in activity and biodistribution, possibly related to differences in GHR linkages, which paves the way for future research.

Keywords: G118R-mGH antagonist; Bioassay; Murine growth hormone (mGH); GH receptor (GHR); CNS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de número de aminoácidos, peso molecular e valor de pI entre a proteína mGH e a proteína hGH.....44

Tabela 2 – Resultados das análises do gráfico do controle positivo hGH, grupo mGH e grupo G118R-mGH. Está sendo indicado o número de animais de cada grupo, a significância (P) e a razão (R²).....89

Tabela 3 – Estudo de estabilidade dos produtos marcados com ¹³¹I (*in vitro*) e medição da atividade no contador Gama, de quatro amostras tanto mGH quanto G118R-mGH, nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas.....92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do sistema porta hipotalâmico-hipofisário.....	29
Figura 2 – Esquema do mecanismo de <i>feedback</i> para a regulação da secreção do GH.....	31
Figura 3 – Grelina: sua produção e seu efeito na síntese e secreção do GH.....	33
Figura 4 – Secção coronal do cérebro (corte nos gânglios da base). Ilustração da região do terceiro ventrículo.....	36
Figura 5 – Ilustração da organização do domínio do GHR.....	38
Figura 6 – Ilustração da ativação do GHR a partir da ligação e dimerização do hormônio de crescimento.....	39
Figura 7 – Ilustração da translocação de STAT5 para o núcleo, ligando-se no DNA.....	40
Figura 8 – Ilustração da regulação negativa da sinalização do GHR.....	41
Figura 9 – Ilustração da sequência de mGH: nucleotídeos e respectivos aminoácidos conforme descrito no NCBI, <i>Mus musculus</i> Growth Hormone (GenBank Accession number: NM_008117.3). O peptídeo sinal de 26 aminoácidos está sublinhado em amarelo.....	43
Figura 10 – Ilustração da molécula da proteína mGH, produzida por AlphaFold.....	44
Figura 11 – Ilustração do alinhamento de aminoácidos entre mGH e hGH, sem o peptídeo sinal.....	46
Figura 12 – Ilustração da cristalografia do complexo heterotrimérico. Molécula de hGH em azul e duas moléculas do GHR (domínio extracelular) em vermelho e verde. A ligação da glicina-120 hGH, em amarelo, com o triptofano-104 do hGHR, em branco, estão sendo indicados com a seta.....	48
Figura 13 – Ilustração do preenchimento parcial da “fenda” com a substituição de glicina para arginina na terceira hélice de bGH. (A) a seta indica o local da “fenda” devido à glicina. (B) a seta indica o preenchimento da “fenda” pela arginina.....	49
Figura 14 – Ilustração da sequência de mGH, nucleotídeos e respectivos aminoácidos obtidos no NCBI, <i>Mus musculus</i> Growth Hormone (GenBank Accession number: NM_008117.3). Na posição do aminoácido 118, o códon para glicina “GGC” (MM = 75,07 g/mol) foi substituído pelo códon para arginina “CGC” (MM = 174,2 g/mol), da proteína madura (190 aa total)	50

Figura 15 – Ilustração da sequência completa de aminoácidos da molécula de hGH, com todos os resíduos de tirosina circundados em vermelho.....	55
Figura 16 – Ilustração da radioiodação com iodeto de sódio (Na ¹³¹ I) e a introdução dos átomos de ¹³¹ I no resíduo de tirosina, no anel aromático de hidroxila, provocando uma troca eletrolítica por oxidação da CLT.....	56
Figura 17 – Ilustração do mapa do vetor pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®). Na imagem estão destacadas suas respectivas regiões: AmpR: resistência ao antibiótico ampicilina; CMV promoter: promotor de citomegalovírus; MCS: sítio múltiplo de clonagem (local em que insere o gene de interesse), e são indicadas também as enzimas de restrição que são utilizadas para clonagem; WPRE: elemento regulatório pós-traducional de vírus de hepatite WoodChuck; F1 ori: origem de replicação de fago; SV40 promoter: região promotora de vírus vacuolante símio 40; NeoR/KanR: resistência aos antibióticos neomicina e kanamicina; Ori: origem de replicação.....	58
Figura 18 – Ilustração da comparação do tamanho corporal entre um camundongo anão (lit/lit) (10g) e um camundongo heterozigoto (25g)	62
Figura 19 – Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, após eletroforese com amostra do PCR do plasmídeo pcDNA 3.1-mGH. (1) marcador de peso molecular de 100 pb; (2) amostra com PCR pcDNA 3.1-mGH com primer forward 5' TGCTTGGCAATGGCTACA 3' e reverse 5' CTGGTGAGTGGCTAGAAG 3', resultando em fragmento de 700 pb. (3) amostra com PCR do pcDNA 3.1-mGH com os primers forward 5' GCA ATG GCT ACA GAC TCT CGG ACC 3' e reverse 5' CTA GAA GGC ACA GCT GCT TTC CAC 3', resultando em fragmento de 651 pb. A seta branca indica o fragmento utilizado para construção do plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO-mGH.....	67
Figura 20 – Sequenciamento do mGH realizado na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), e comparação com a sequência já conhecida e estabelecida no NCBI, <i>Mus musculus</i> Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3). Está sendo indicado em amarelo o início do peptídeo sinal ATG e o stop códon TAG, e em azul a região que irá sofrer a mutação para o antagonista.....	68
Figura 21 – Foto da eletroforese do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, com amostras após PCR realizado com o kit do pcDNA 3.4-TOPO para confirmação da presença do mGH. (1) marcador de massa molecular de 100 pb; (2) controle positivo do kit com fragmento de 500 pb; (3) amostra do PCR com pcDNA 3.4 G118R-mGH, controle positivo, com 908 pb; (4), (5) e (6) PCR de três colônias 908 pb; (7) amostra com PCR do pcDNA 3.1-mGH, como controle negativo; (8) marcador de massa molecular de 10000 pb.....	70
Figura 22 – Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, com amostras do PCR realizado com o primer forward do kit do pcDNA 3.4-TOPO e o primer reverse do mGH, para confirmar a orientação correta do mGH. (1) marcador de massa molecular de 100 pb; (2) PCR de uma colônia com os primers do kit do pcDNA 3.4 TOPO, 908 pb; (3) e (4) duas colônias do G118R-mGH, controle positivo, 808 pb; (5), (6) e (7) três colônias pcDNA 3.4 TOPO-mGH, 808 pb; (8) marcador de massa molecular de 10000 pb.....	70

Figura 23 – Sequenciamento realizado na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), em comparação com a sequência já conhecida e estabelecida no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3). **(A)** mGH, sublinhado em azul o códon para Glicina “GGC” na posição 118 da proteína madura; **(B)** G118R-mGH, sublinhado em verde o códon da Arginina “CGC” na posição 118 indicando a mutação. O início e final do cDNA estão em amarelo.....71

Figura 24 – Foto da análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, não reduzido, referente à produção em células HEK293F. **(A)** produção do mGH: (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg; (3) a (9) amostras de mGH dos dias 1 a 7. A seta branca indica o quarto dia de produção. **(B)** (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg; (3) a (9) amostras de G118R-mGH dos dias 1 a 7. A seta branca indica o quarto dia de produção.....74

Figura 25 – Western Blotting das amostras do meio condicionado HEK293F. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 100 ng, (3) e (4), amostras dos dias 4 e 5 da produção do mGH; (5) e (6) amostras dos dias 4 e 5 da produção do G118R-mGH; (7), controle negativo de transfecção.....75

Figura 26 – Cromatograma da purificação com a coluna contendo a resina Q-Sepharose Fast Flow (QFF), em unidade de absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Frações coletadas, 5mL em cada, indicadas em vermelho. Em verde é representado o gradiente de NaCl. **(A)** G118R-mGH, fração #12 corresponde a 238 mM de NaCl (11,9% de tampão B), e fração #15 corresponde a 284 mM de NaCl (14,2% de tampão B); **(B)** mGH, fração #14 corresponde a 264 mM de NaCl (13,2% de tampão B)76

Figura 27 – SDS-PAGE 15%, não reduzido, das amostras coletadas da QFF. **A:** mGH, (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3) meio condicionado pool antes da diálise; (4) meio condicionado pool depois da diálise, (5-10) frações 7,10,14,17,21 e 36, A fração 14 está indicada pela seta branca. **B:** (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3) pool de meio condicionado antes da diálise; (4) pool de meio condicionado depois da diálise, (5-8) frações 11, 12, 13 e 14, indicadas pelas setas brancas; (9-10) frações 15 e 16..... 77

Figura 28 – Western blotting de amostras coletadas da QFF, não reduzido. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3-6) mGH frações 11, 12, 13 e 14, setas azuis, (7-10) G118R-mGH frações 11, 12, 13 e 14, setas brancas.....78

Figura 29 – Cromatogramas do HPSEC. A: rec-hGH (controle interno), 5 µg/ 5 µL, com pico de TR 13,7 min; B: pit- mGH (NIH), 5 µg/ 50 µL, seta com TR 15,8 min, (C) mGH QFF pool #11-14 – seta indica pico com TR 15,63 min, (D) G118R-mGH QFF pool #11-14 – setas indicam picos com TR 15,8 min e 16,8 min.....79

Figura 30 – Ampliação do cromatograma do HPSEC com coleta do G118R-mGH, entre 12 e 20 min, para análise por WB.....81

Figura 31 – Western blotting das frações coletadas na HPSEC que contém G118R-mGH. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3 – 7) amostras não-reduzidas

das frações 5-9. (9-10) amostras reduzidas das frações 6 e 8.....82

Figura 32 – Cromatogramas obtidos por HPSEC do pool da purificação de mGH e G118R-mGH após diálise em NaCl 9%. **(A)** mGH, com T_R 16,87 min e **(B)** G118R-mGH, T_R 17 min e 17,87 min.....83

Figura 33 – Espectrometria de massa após a dessalinização das amostras. **(A)** mGH e **(B)** G118R-mGH, ambos indicados pela seta preta.....85

Figura 34 – Genotipagem por PCR seguido de digestão para identificação de camundongos anões. Foto do gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, após eletroforese com amostras de PCR. (1) marcador de massa molecular. (2-8) PCR dos camundongos. Setas brancas camundongos anões, setas azuis heterozigotos.....86

Figura 35 – Análise dos resultados do bioensaio realizado nos camundongo anões lit/lit. **(A)** Controle positivo hGH, variação de massa durante dez dias, em verde. **(B)** Grupo lit/lit mGH, variação de massa durante dez dias, em roxo. **(C)** Grupo lit/lit G118R-mGH, variação de massa durante dez dias, em vermelho. O grupo controle lit/lit salina está em preto, e o grupo controle de peso heterozigoto está em azul.....88

Figura 36 – Cromatografia por SPECT do **(A)** mGH e do **(B)** G118R-mGH, marcados com ^{131}I em vermelho e o ^{131}I livre em verde.....90

Figura 37 – Cromatogramas obtidas por HPSEC realizado para avaliação dos impactos da cloramina T. **(A)** rec-hGH (controle interno), 5 μg / 5 μL , com pico no T_R 14,10 min; **(B)** mGH – NaCl 0,9%, com pico no T_R 15,26 min; **(C)** mGH – NaCl 0,9% com reação de CLT, com pico no T_R 15,35 min; **(D)** comparação por sobreposição da solução de mGH não tratada, em preto, e da solução do mGH com a reação de CLT, em vermelho. **(E)** G118R-mGH – NaCl 0,9% com picos nos T_R 16 e 17,62 min; **(F)** G118R-mGH – NaCl 0,9%, com picos nos T_R 15,6 min e 17,24 min; **(G)** comparação por sobreposição da solução de G118R-mGH não tratada, em preto, e da solução do G118R-mGH com a reação de CLT, em vermelho.....93

Figura 38 – Avaliação do impacto da cloramina T, em SDS-PAGE 15% - amostras mGH e G118R-mGH. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 μg , (3) amostra mGH-NaCl 0,9%, (4) amostra mGH-NaCl 0,9% após reação com a CLT, (5) amostra mGH-NaCl 0,9% reduzido, (6) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9%, (7) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9% após reação com a CLT, (8) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9% reduzido.....95

Figura 39 – Ensaio de biodistribuição em camundongos, injetados com ^{131}I -mGH (preto) e ^{131}I -G118R-mGH (cinza), com atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto – CPM) e 0,16 μg de cada hormônio, eutanasiados após 45 minutos da injeção intraperitoneal. Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g). (A) Porcentagem da dose injetada por μL de sangue; (B) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do cérebro total; (C) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do cérebro; (D) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do hipotálamo; (E)

Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do córtex motor.....96

Figura 40 – Ensaio de biodistribuição em camundongos, injetados com ¹³¹I-mGH (preto) e ¹³¹I-G118R-mGH (cinza), com atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto – CPM) e 0,16 µg de cada hormônio, eutanasiados após 45 minutos da injeção intraperitoneal. Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g)97

Figura 41 – Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 2 minutos após a injeção de ¹²³I-mGH ou ¹²³I-G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-mGH, **(A)** secção coronal; **(B)** secção sagital; **(C)** secção transversal; **(D)** cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-G118R-mGH, **(E)** secção coronal; **(F)** secção sagital; **(G)** secção transversal; **(H)** cérebro inteiro visto de cima.....98

Figura 42 – Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 5 minutos após a injeção de ¹²³I-mGH ou ¹²³I-G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-mGH, **(A)** secção coronal; **(B)** secção sagital; **(C)** secção transversal; **(D)** cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-G118R-mGH, **(E)** secção coronal; **(F)** secção sagital; **(G)** secção transversal; **(H)** cérebro inteiro visto de cima.....98

Figura 43 – Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 10 minutos após a injeção de ¹²³I-mGH ou ¹²³I-G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-mGH, **(A)** secção coronal; **(B)** secção sagital; **(C)** secção transversal; **(D)** cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ¹²³I-G118R-mGH, **(E)** secção coronal; **(F)** secção sagital; **(G)** secção transversal; **(H)** cérebro inteiro visto de cima.....99

Figura 44 – Gráfico identificando a média de contagem da atividade (CPM) dos radiomarcados ¹²³I-mGH ou ¹²³I-G118R-mGH nas diferentes regiões do cérebro de camundongo eutanasiado **(A)** 2 minutos, **(B)** 5 minutos e **(C)** 10 minutos após a injeção. Na imagem estão destacadas suas respectivas regiões: RSTR: estriado direito; LSTR: estriado esquerdo; CTX: córtex; RHIP: hipocampo direito; LHIP: hipocampo esquerdo; THA: tálamo; CB: cerebelo; BFS: prosencéfalo basal e septo; HYP: hipotálamo; RAMY: amígdala direita; LAMY: amígdala esquerda; BS: tronco cerebral; CG: substância cinzenta periaquedutal; SC: colículo superior; OLF: bulbo olfatório; RMID: mesencéfalo direito; LMID: mesencéfalo esquerdo; LIC: colículo inferior esquerdo; RIC: colículo inferior direito.....100

Figura 45 – Gráficos de análise da cinética de permeação nas regiões do cérebro, comparando ¹²³I-mGH e ¹²³I-G118R-mGH. **(A)** hipocampo esquerdo; **(B)** hipocampo direito; **(C)** hipotálamo; **(D)** amígdala direita; **(E)** tronco cerebral; **(F)** amígdala esquerda.....102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Celsius

µg – micrograma(s)

µL – microlitro(s)

µM – micro molar

¹²³I – Iodo-123

¹³¹I – Iodo-131

%ID/g – Porcentagem de dose injetada por grama de tecido

aa – aminoácido (s)

ACTH – adrenocorticotropina

AGL – Ácidos graxos livres

AgRP – peptídeo relacionado agouti

AmpR – resistência ao antibiótico ampicilina

ARH – Núcleo arqueado do hipotálamo

bGH – hormônio do crescimento bovino

BHE – barreira hematoencefálica

BHK – fibroblastos renais de hamster bebê

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CDS – sequência codificadora

CEBIO – centro de biotecnologia

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ChAT – colina acetiltransferase

CHO – ovário de hamster chinês

CLT – Cloramina T

CMV promotor – promotor de citomegalovírus

CO₂ – dióxido de carbono

CP – Plexo coróide

CPM – contagem por minuto

CRH – homologia do receptor de citocina

CVOs – Órgãos circunventriculares

Da – Dalton (s)

DMH – núcleo dorsomedial

DMX – núcleo motor dorsal do vago

ECD – domínio extracelular

EPOR – receptor de eritropoietina

F1 ori – origem de replicação de fago

FSH – hormônio folículo-estimulante

GHA – antagonista de hormônio do crescimento

GHBPs – proteínas de ligação de hormônio do crescimento

GHR – receptor de hormônio do crescimento

GHRH – Hormônio liberador do hormônio do crescimento

G120R – antagonista de receptor de hormônio de crescimento humano

G118R-mGH – antagonista de receptor hormônio do crescimento de camundongo

HEK293 – rim de embrião humano

hGH – hormônio do crescimento humano

HPSEC – Cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular

HT-1080 – células humanas de fibrossarcoma

ICD – domínio intracelular citoplasmático

IGFBP – proteínas de transporte de fator de crescimento semelhante à insulina

IGF- I – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IR – receptor de insulina

JAK2 – Janus quinase 2

kDa – kilo Dalton (s)

LB – meio Luria-Bertani

Lep – leptina

LepR – receptor de leptina

LH – hormônio luteinizante

Lit – little

MBq – mega becquerel

MCS – sítio múltiplo de clonagem

ME – Eminência mediana

mGH – hormônio do crescimento de camundongo

MPTs – modificações pós-traducionais

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

Na¹³¹I – Iodeto de sódio

Na₂S₂O₅ – Metabissulfito de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NeoR/KanR – resistência aos antibióticos neomicina e kanamicina

ng – nanograma (s)

NS0 – células de mieloma murino

Ori – origem de replicação

PBS – tampão de fosfato salino

PCR – reação em cadeia polimerase

pH – ponto hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PIAS – proteína inibidora de STAT ativada

POMC – proopiomelanocortina

PRL – prolactina

PRLR – receptor de prolactina

pSTAT5 – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5 fosforilada

PTP – proteína tirosina fosfatase

PV – núcleos hipotalâmicos periventriculares

PVH – núcleos hipotalâmicos paraventriculares

RE – retículo endoplasmático

rec-hGH – hormônio do crescimento humano recombinante

Rf – fator de retenção

rGH – hormônio de crescimento de rato

RNA – ácido ribonucleico

Rpm – rotação por minuto

SNC – Sistema nervoso central

SOCS – proteína supressora da sinalização de citocina

SPECT – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

SPECT-CT – Tomografia computadorizada de emissão de fóton único/ tomografia computadorizada

SST – Somatostatina

STAT1 – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 1

STAT3 – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 3

STAT5 – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5

STAT5a – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5a

STAT5b – ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação 5b

SV40 promotor – região promotora de vírus vacuolante símio 40

TH – tirosina hidroxilase

TMD – domínio transmembranar de passagem única

T_R – tempo de retenção

TSH – hormônio tireoestimulante

U – unidade (s)

VMN – núcleo ventromedial

WPRE – elemento regulatório pós-traducional de vírus de hepatite WoodChuck

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
3.1. Hipotálamo e hipófise.....	28
3.2. Hormônio de crescimento.....	30
3.3. Receptor do hormônio de crescimento.....	37
3.4. Hormônio de crescimento de camundongo.....	42
3.5. Antagonista de receptor do hormônio de crescimento de camundongo (G118R-mGH)	46
3.6. Doenças relacionadas ao hormônio de crescimento.....	51
3.7. Experiências do CEBIO em produção de proteína, expressão em células de mamíferos, bioensaio e radiomarcação no CEBIO.....	52
3.7.1. Produção de proteínas recombinantes e expressão em células de mamíferos.....	52
3.7.2. Ensaios <i>in vivo</i>	54
3.7.3. Radiomarcação.....	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1. Plasmídeos pcDNA 3.4-TOPO-mGH e G118R-mGH.....	57
4.1.1. Construção do plasmídeo pcDNA 3.4-TOPO-mGH e G118R-mGH.....	57
4.1.2. Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5 α com o plasmídeo pcDNA 3.4-mGH e pcDNA 3.4-G118R-mGH.....	59
4.2. Produção de mGH e G118R-mGH em células HEK293F	60
4.2.1. Transfecção transiente em células HEK293F.....	60
4.2.2. Análise da produção de mGH e G118R-mGH por SDS-PAGE e Western Blotting.....	60
4.3. Caracterização e purificação do mGH e G118R-mGH.....	61
4.4. Bioensaio para avaliar atividade do mGH e G118R-mGH.....	61
4.4.1. Camundongos anões.....	61

4.4.2. Genotipagem dos camundongo nascidos de fêmeas heterozigotas e machos anões.....	62
4.4.3. Aplicação de mGH e G118R-mGH nos camundongos.....	63
4.5. Radiomarcção com ¹²³ I e ¹³¹ I.....	64
4.5.1. Estudo de estabilidade da marcação com iodo (<i>in vitro</i>)	64
4.5.2. Impactos da cloramina T no mGH e G118R-mGH.....	65
4.5.3. Ensaio de biodistribuição em camundongos C57BL/6J.....	65
4.5.4. Avaliação da passagem do mGH e G118R-mGH pela BHE por SPECT-CT	66
5. RESULTADOS	66
5.1. Síntese do plasmídeo pcDNA 3.4- TOPO-mGH e 3.4- TOPO- G118R-mGH.....	66
5.1.1. Construção dos primers e plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO-mGH e 3.4-TOPO- G118R-mGH.....	66
5.1.2. Transformação de bactérias competentes <i>Escherichia coli DH5α</i>	69
5.2. Produção de mGH e G118R-mGH em células HEK293F.....	74
5.3. Purificação e caracterização do mGH e G118R-mGH.....	75
5.3.1. Purificação utilizando técnica cromatográfica de troca iônica do mGH e G118R-mGH.....	76
5.3.2. Análise por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC) do mGH e G118R-mGH.....	79
5.3.3. Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) do mGH e G118R-mGH.....	84
5.4. Bioensaio para avaliar a atividade do mGH e G118R-mGH.....	86
5.4.1. Genotipagem.....	86
5.4.2. Bioensaio	87
5.5. Radiomarcção com ¹²³ I e ¹³¹ I.....	90
5.5.1. Estudo da estabilidade da marcação com ¹³¹ I.....	92
5.5.2. Impactos da cloramina T.....	92
5.5.3. Ensaio de biodistribuição - ¹³¹ I.....	96
5.5.4. Ensaio de imagem por SPECT-CT - ¹²³ I.....	97
6. DISCUSSÃO	103

6.1. Expressão, caracterização e purificação do mGH e G118R-mGH.....	103
6.2. Bioensaio.....	106
6.3. Radiomarcção e os estudos em camundongo.....	108
7. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

1. INTRODUÇÃO

Os avanços gerados na área da biotecnologia decorrentes da técnica do DNA recombinante têm permitido a investigação e produção de uma variedade de proteínas recombinantes de interesse industrial, clínico e de pesquisa.

A partir da insulina, primeira proteína recombinante produzida comercialmente, outros diversos produtos recombinantes ganharam notoriedade: a eritropoietina (Bommer e col., 1987), o hormônio do crescimento (GH) (Ribela e col., 1993, Oliveira e col., 1999; Bellini e col.1993; 2003), hormônio tireotrófico humano (TSH) (Peroni e col, 2002, Ribela e col., 2003, Ventini e col., 2011).

Entre os produtos recombinantes citados acima se destacam os hormônios hipofisários, uma classe de produtos com diversas funcionalidades não só no âmbito da pesquisa estrutural, funcional, mas também no desenvolvimento de novos fármacos (Morganti e col., 1998, Soares e col., 2000; 2006, Ueda e col., 2009). Além disso, muitas deficiências fisiológicas têm relação direta com a síntese e/ou regulação desses hormônios sendo a administração recorrente desses produtos a única forma de tratamento (Musolino, 2003, Geber e col., 2005, Portes, 2008, Soares e col., 2008).

O hormônio do crescimento (GH) é secretado pela glândula hipofisária anterior e está relacionado com a regulação de diversas funções fisiológicas importantes, como proliferação celular, crescimento tecidual, síntese proteica, metabolismo de carboidratos e lipídios, entre outras. Classicamente, os principais tecidos-alvo do GH são o fígado, músculo esquelético, ossos e tecido adiposo que, em seu conjunto, acreditava-se serem responsáveis pelos principais efeitos biológicos desse hormônio (Devesa e col., 2010). Contudo, evidências recentes têm indicado que o sistema nervoso central (CNS) também é um tecido-alvo crítico para muitas das funções biológicas do GH que incluem a regulação do metabolismo, controle de funções cognitivas diversas, modulação de comportamentos, ação neurotrófica, entre outras (Furigo e col., 2017).

O hormônio de crescimento murino (mGH) é uma proteína de 21,8 kDa que consiste em 190 aminoácidos. Contém quatro resíduos de cisteína e duas ligações dissulfeto, assim como os GH humano, bovino, ovino, pirarucu, suíno e de enguia (Fradkin e Boand, 2010; Lima e col., 2023). Para determinados estudos utilizando modelos animais murinos, é preferível o uso espécie-específico do hormônio, para evitar a tolerância à exposição, desenvolvimento de respostas imunes inatas e interação com outros receptores, como no caso do hormônio de crescimento humano (hGH), que é capaz de se ligar aos receptores de prolactina em camundongos (Amit e col., 1992; Fradkin e col., 2009).

A terapia com mGH é capaz de restaurar os efeitos causados pela deficiência da atividade hormonal de camundongos transgênicos, que apresentam ablação do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH). Esses animais apresentam uma diminuição dos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), especialmente no fígado, tecido adiposo aumentado, redução da massa magra, pesos hepáticos e esplênicos reduzidos e fenótipo anão, características que podem ser revertidas com a aplicação do hormônio nos estágios iniciais do desenvolvimento do animal (Alba e col., 2005).

O desenvolvimento do antagonista do receptor de hGH (GHA), com uma mutação do códon de glicina (no aminoácido 120), substituído por arginina (R), permite que o sítio 1 se ligue ao receptor do hormônio do crescimento (GHR), mas impede a ligação funcional no sítio 2, inviabilizando a sinalização intracelular. Assim surgiu um inibidor competitivo do hGH (G120R-hGH) e o desenvolvimento do fármaco Pegvisomant, usado para tratar pacientes com acromegalia e em estudos que visam compreender a atividade do GH (Kopchick e col., 2014).

Dessa forma, no presente trabalho foi realizada a síntese do mGH e do seu potencial antagonista G118R-mGH em células HEK293F (células de rim de embrião humano), o que permitiu investigar, em um modelo homólogo, os efeitos fisiológicos da ação do mGH em camundongos. Um dos nossos objetivos foi avaliar a sua atuação no SNC, bem como estudar o mecanismo da passagem do mGH através da barreira hematoencefálica (BHE).

Este estudo fez parte do projeto temático FAPESP (processo 2020/01318-8) intitulado: “Sistema nervoso central como um alvo do hormônio do crescimento para a regulação de múltiplas funções biológicas“, coordenado pelo Dr. José Donato do ICB/USP, cuja finalidade foi redefinir os mecanismos de ação do GH, incluindo o SNC. O mGH radiomarcado pelo iodo-123 (¹²³I) foi injetado na circulação do camundongo e, por meio de análises por SPECT-CT, possibilitou observar a passagem do hormônio radiomarcado da circulação sistêmica para o SNC, enquanto o GHA que atua como um inibidor competitivo, forneceu respostas sobre a necessidade da presença do receptor do hormônio de crescimento (GHR) para a passagem desse hormônio através da BHE.

Ainda nesse trabalho realizamos a avaliação da potência dessas proteínas recombinantes em ensaio biológico utilizando camundongos com deficiência de crescimento (Bellini e Bartolini, 1993; Bellini e col., 1998; Higuti e col., 2012).

Essa pesquisa é uma continuidade de um vasto estudo de proteínas recombinantes do Centro de Biotecnologia (CEBIO), e apresenta originalidade principalmente em três aspectos: a síntese de forma inédita do mGH e do seu potencial antagonista de receptor G118R-mGH; o desenvolvimento de um sistema de expressão em células por transfecção transiente; e um modelo original de estudo fisiológico sobre a passagem do GH através da BHE por meio da interação do mGH e seu antagonista.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi realizar a expressão, purificação e caracterização físico-química e biológica do mGH e do seu antagonista de receptor G118R-mGH (GHA).

2.1 Objetivos específicos

- Obtenção de vetores contendo o cDNA do mGH e G118R-mGH para expressão em células de mamífero;
- Transfecção de células HEK293F cultivadas em suspensão;
- Expressão do mGH e G118R-mGH de forma transiente em meio de cultura livre de soro em quantidades úteis (>30 µg/mL de meio);
- Purificação e caracterização físico-química do mGH e do seu antagonista;
- Radiomarcção com ¹³¹I e ¹²³I para avaliar a atividade biológica de ambas as proteínas no sistema nervoso central;
- Avaliação da atividade biológica em camundongos anões.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

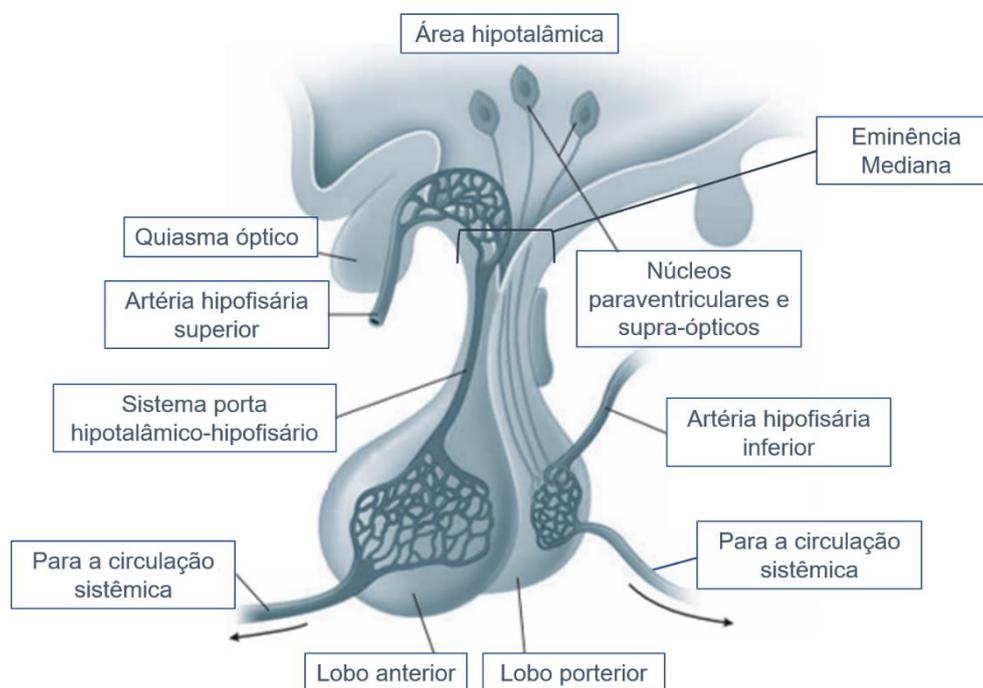
3.1 Hipotálamo e hipófise

No sistema endócrino, o hipotálamo e a hipófise, localizados no sistema nervoso central (SNC), atuam como mediadores dominantes no controle da secreção dos hormônios e suas regulações em termos das quantidades circulante no sistema. Esses hormônios secretados possuem importantes papéis homeostáticos e metabólicos, agindo desde o controle da fisiologia da tireóide até a reprodução (Golan e col., 2010).

A hipófise está localizada na sela túrcica, em uma cavidade óssea da base do cérebro. É formada por dois órgãos associados, a neuro-hipófise, conhecida como hipófise posterior, provinda da superfície ventral do diencéfalo, e a adeno-hipófise, conhecida como hipófise anterior, provinda do tecido ectodérmico. O hipotálamo regula atividade de ambos os lobos, como um transdutor neuroendócrino, transformando sinais neurais do cérebro em mensagens químicas (normalmente peptídios) para regulação da secreção dos hormônios hipofisários e para as funções metabólicas do organismo (Golan e col., 2010; Guyton & Hall, 2011).

O controle hipotalâmico da adeno-hipófise acontece a partir da secreção dos hormônios no sistema vascular porta-hipotalâmico-hipofisário (Figura 1). Nesse processo, os neurônios do hipotálamo liberam fatores reguladores, a partir de estímulos recebidos pela artéria hipofisária superior viabilizando a liberação dos fatores hipotalâmicos na corrente sanguínea, sendo levados pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário até a adeno-hipófise onde será controlada a liberação dos hormônios andeno-hipofisários. No caso dos hormônios da neuro-hipófise, são sintetizados nos corpos celulares supra-ópticos e paraventriculares e são acomodados nas terminações neuronais na neuro-hipófise até receber um estímulo e serem liberados na corrente sanguínea.

Figura 1: Representação do sistema porta hipotalâmico-hipofisário.



Fonte: Adaptado de Golan e col., 2010.

A adeno-hipófise é formada por um conjunto grande de células heterogêneas, como as somatotropos, corticotropos, tireotropos, gonadotropos, lactotropos. Cada uma é responsável por responder a estímulos diferentes e assim liberar hormônios específicos na circulação sistêmica. Existem fatores hipotalâmicos de liberação e inibição, conhecidos como hormônios liberadores e hormônios hipotalâmicos inibidores, respectivamente, para modificar a secreção hormonal, além de agir na síntese de hormônios e o crescimento de células hipofisárias (Golan e col., 2010; Guyton & Hall, 2011).

Na adeno-hipófise são produzidos hormônios proteicos e glicoproteicos. Dentre eles, temos os hormônios somatotróficos, como o hormônio de crescimento (GH) e a prolactina, sendo proteínas monoméricas. Temos os hormônios glicoprotéicos, como o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio tireoestimulante (TSH), que são proteínas heterodiméricas. Além desses, há também adrenocorticotropina (ACTH) (Golan e col., 2010).

3.2. Hormônio de crescimento

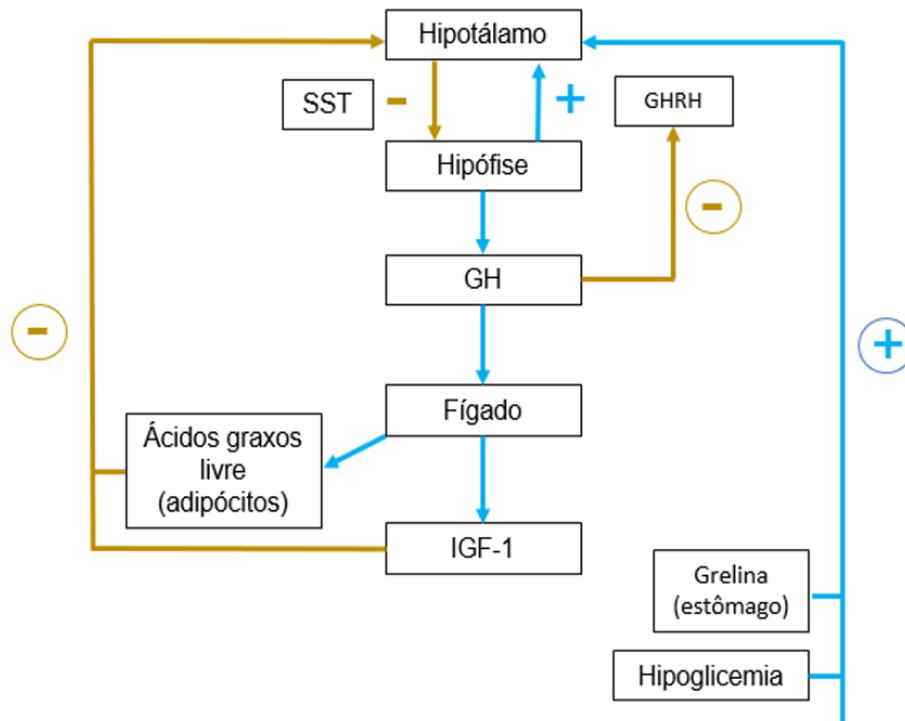
O hormônio de crescimento humano (hGH), também conhecido como hormônio somatotrópico ou somatotropina, é uma proteína monomérica, ou seja, é formado por uma única cadeia polipeptídica, constituída por 191 aminoácidos e com peso molecular de 22 kDa. É um hormônio hipofisário, produzido e secretado pelas células somatotrópicas na adeno-hipófise ou hipófise anterior (Guyton & Hall, 2011; Buchman e col., 2018; Olarescu e col., 2019). Quando esse hormônio é liberado na corrente sanguínea, ele alcança diversos tecidos alvos viabilizando vários efeitos no corpo, não agindo por meio de glândulas-alvos como no caso de outros hormônios (Guyton & Hall, 2011; Devesa e col., 2016).

Sua atuação principal está envolvida no crescimento de quase todos os tecidos do corpo, induzindo a divisão celular e a diferenciação celular, como, por exemplo, o crescimento das células ósseas e musculares. Porém, já foi observado que também tem como função promover regulação de vários processos metabólicos, como a indução de absorção de glicose e lipólise em tecidos adiposos, indução da absorção de glicose e absorção de aminoácidos nos músculos (Guyton & Hall, 2011; Olarescu e col., 2019). Essas ações podem ocorrer tanto de forma direta, pelo próprio receptor, quanto de forma indireta, por indução da secreção do fator de crescimento semelhantes à insulina I (IGF-I), hormônio liberado pelos hepatócitos, células do fígado (Jones & Clemmons, 1995; Golan e col., 2010; Guyton & Hall, 2011).

A regulação da secreção do GH pela hipófise ocorre por um complexo mecanismo de respostas através das mudanças de seus níveis circulantes no organismo, para um controle homeostático, sendo intermediado por vários mecanismos de *feedbacks* positivos (induzindo) e negativos (inibindo) (Figura 2). A indução da secreção do GH ocorre quando o hipotálamo libera o hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), e a inibição ocorre quando o hipotálamo libera a somatostatina (SST), ambos no sistema vascular porta-hipotalâmico-hipofisário (Steyn e col., 2016). A interação entre ambos os

peptídeos hipotalâmicos, em conjunto com secretagogos adicionais, resulta na regulação da secreção pulsátil do GH. Ademais, o GH, que está na circulação, pode retornar para o sistema nervoso central para também sinalizar e regular seus níveis circulantes (Steyn e col., 2016).

Figura 2: Esquema do mecanismo de *feedbacks* para a regulação da secreção do GH.



Fonte: Adaptado de Olarescu e col., 2019; Fernández-Pérez et al., 2013.

O GH atua no fígado como um dos principais tecidos-alvo, estimulando a produção local (cerca de 75%) e sistêmica do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), também conhecido como somatomedina C, transportada na circulação pelas ligações de proteínas de transporte (IGFBP), e através dessa produção induzida, o GH consegue atuar no corpo de forma indireta.

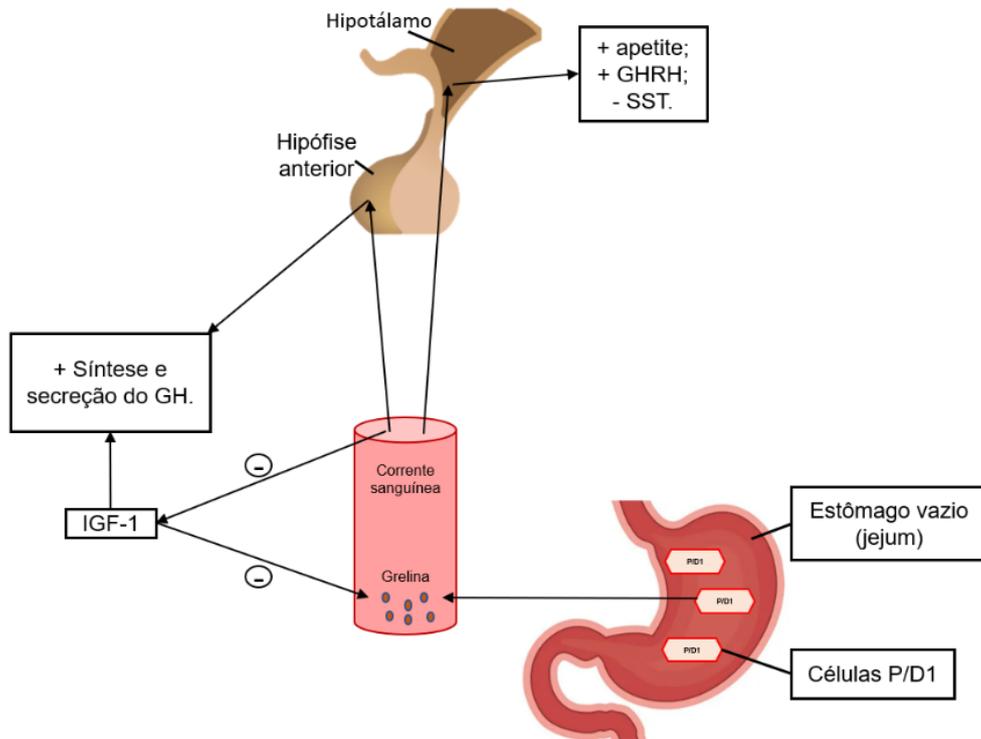
O IGF-1 é um polipeptídeo contendo 70 aminoácidos com um peso molecular de 7,649 Da (Rinderknecht & Humbel, 1978). O IGF-1 pertence a uma superfamília de hormônios semelhantes à insulina, que inclui a própria insulina, bem como o IGF-1 e IGF-2, todos similares em estrutura terciária e

sequência de aminoácidos primários, mas se ligam a diferentes receptores para ter efeitos distintos no desenvolvimento. Embora o IGF-1 seja produzido principalmente em adultos pelo fígado em resposta ao GH e afeta uma ampla variedade de tipos de células, seu efeito sobre o desenvolvimento precoce do SNC e plasticidade neuronal sugere que o IGF-1 atua como um hormônio com ação parácrina e autócrina (Jones & Clemmons, 1995; Yakar e col., 1999).

Quando o IGF-1 está elevado na circulação, ocorre uma sinalização do mecanismo de *feedback* negativo pelo eixo GH-IGF-1 (Gahete e col., 2011). Ou seja, o GHRH é inibido através desse *feedback* devido à alta concentração do GH e IGF-1 na corrente sanguínea (Fernández-Pérez e col., 2013) (Figura 2).

O padrão de liberação do GH é pulsátil (aumenta e diminui) na circulação, e diversos fatores, como ingestão de alimentos, estresse e equilíbrio metabólico também estimulam sua secreção. A grelina, acil grelina (forma octanoilada, ativa), é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos, produzida no estômago, e está presente na corrente sanguínea em períodos de jejum, e assim atinge o SNC sinalizando fome (hormônio orexígeno). Dessa forma, a grelina, na hipófise, tem ação de induzir também a secreção do GH (Devesa, 2021). Quando o ser vivo está em jejum, com o estômago vazio, a produção de grelina aumenta nas células específicas, conhecidas como P/D1 (células oxínticas), logo depois ela é liberada na corrente sanguínea, e assim chega na hipófise, estimulando a síntese e induzindo a secreção do GH. A grelina também alcança o hipotálamo, onde irá induzir os neurônios da fome, estimular a secreção do GHRH e inibir a somatostatina. Além do mais, a grelina também tem um papel de inibir os efeitos inibitórios do IGF-1, e por outro lado, o IGF-1 inibe o aumento da grelina na circulação (Devesa, 2021) (Figura 3).

Figura 3: Grelina: sua produção e seu efeito na síntese e secreção do GH.



Fonte: Adaptado de Devesa, 2021.

A insulina é um dipeptídeo, com cadeias A e B ligadas por pontes dissulfeto, de 51 aminoácidos no total (Wilcox, 2005). A insulina é conhecida por ser um outro fator importante que também atua na regulação do GH, com os níveis de glicose e lipídios na circulação, além dos hábitos alimentares. Dessa forma, a insulina é produzida nas ilhotas pancreáticas e sua atuação ocorre nos neurônios de indução, que expressam GHRH, e inibição, que expressam a somatostatina. Além disso, ela pode se ligar no receptor de insulina (IR) localizado nas células somatotrópicas e inibir a secreção do GH (Qiu e col., 2017). No caso da glicose, se estiver em níveis baixos na circulação (hipoglicemia), também acaba induzindo a secreção de GH, ativando os neurônios GHRH (Roth e col., 1963; Steyn e col., 2016). A insulina também interfere na sinalização do GH no receptor de GH (GHR), e toda sua cascata de ativação (Qiu e col., 2017).

Os ácidos graxos livres (AGL), liberados dos tecidos adiposos, são ácidos carboxílicos com longas cadeias, com um grupo metil em uma extremidade e um carboxílico na outra (Ghosh e col., 2017) e eles também estão envolvidos no processo alimentar, caracterizando um indício de privação alimentar. Os AGL podem induzir, estimulando o GHRH, ou inibir a secreção do GH (Maccario e col., 1994). Um exemplo de caso inibitório, nota-se que em pessoas obesas, quando o AGL está em grande quantidade no organismo concilia com uma redução de secreção de GH (Steyn e col., 2016).

A leptina (Lep) é um hormônio peptídico, produzida e secretada pelos adipócitos, e também é expressa em outros tecidos. Ela é capaz de inibir o apetite e promover a utilização de energia, além de induzir e inibir a secreção de GH dependendo do estado nutricional e do balanço energético do indivíduo (Casanueva e col., 1998; Kalra e col., 1999; Zhang e col., 2017).

A secreção do GH está bem estabelecida, porém ainda se faz necessário continuar as pesquisas sobre as potenciais ações de outros secretagogos e agentes metabólicos envolvidos em toda interação homeostática das liberações pulsáteis do hormônio e de toda sua regulação complexa por meio de mecanismos de *feedback*.

O GH, na circulação, fica parcialmente ligado a uma proteína de ligação de alta afinidade, conhecida como GH *binding protein* (GHBP), formada a partir de uma clivagem do domínio extracelular do receptor de GH (GHR) (Postel-Vinay, 1996; Baumann e col., 1994; Baumann, 2001; Fisker, 2006). Estima-se que as GHBPs são formadas a partir de dois mecanismos: clivagem proteolítica do domínio extracelular do GHR ou através de um *splicing* alternativo na transcrição primária (Postel-Vinay, 1996; Fisker, 2006). Seu papel biológico ainda não está claro, podendo viabilizar ou impedir as ações do GH no organismo (Postel-Vinay, 1996; Baumann, 2001; Fisker, 2006).

A produção local ou secreção pela hipófise do GH possui uma ampla atuação no organismo, promovendo o crescimento e proliferação de diversas células e, conseqüentemente, tecidos, a partir da ampla expressão de seu receptor, o receptor de GH (GHR). O crescimento longitudinal do corpo ocorre a partir do estímulo da produção e da ativação do IGF-1, no fígado,

proporcionando efeitos múltiplos sobre o crescimento ósseo e da massa muscular (Golan e col., 2010; Nicholls e col., 2016; Olarescu e col., 2019).

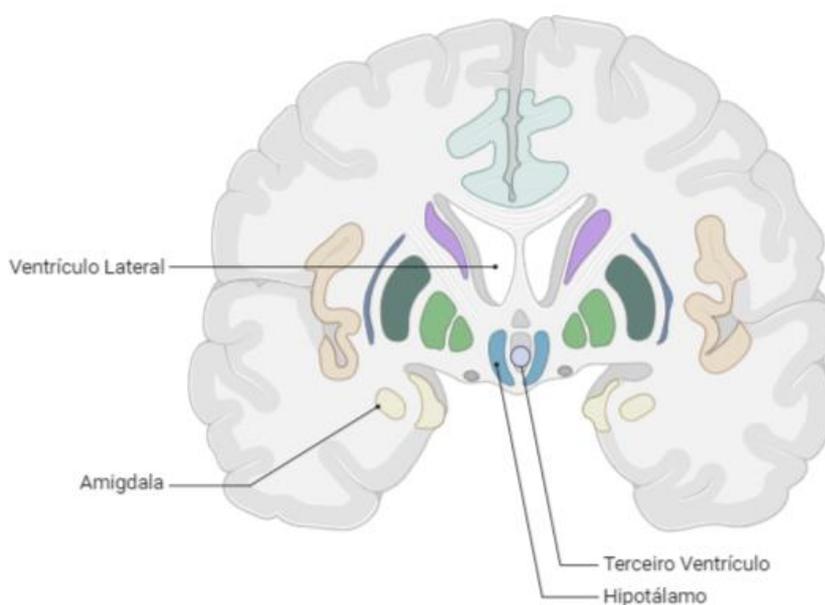
O GH, na sua atuação direta, é um hormônio anabólico que aumenta a síntese de proteína, em quase todas as células, promovendo uma diminuição da oxidação de aminoácidos, além de aumentar a absorção dos aminoácidos no músculo esquelético (Moller & Jorgensen, 2009; Guyton & Hall, 2011). O GH também diminui a oxidação da glicose, promovendo uma absorção da mesma no tecido adiposo e também no músculo, onde a oxidação é reduzida. No tecido adiposo, ocorre o estímulo da lipólise, para assim aumentar os AGLs no próprio tecido adiposo e no sangue, amplificando sua utilização como fonte de energia e, em paralelo, esses acontecimentos inibem as vias de sinalização e ações da insulina em relação ao metabolismo dos carboidratos, lipídios e no controle glicêmico. Logo, o GH possui funções complexas na regulação do metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, com o intuito de aumentar a quantidade de proteína no corpo e assim manter uma reserva de gordura e energética (Moller & Jorgensen., 2009; Guyton & Hall, 2011; Vijayakumar et al., 2011; Olarescu e col., 2019).

Nos dias de hoje, além de toda sua atuação nos tecidos-alvos como fígado, músculo e tecido adiposo, está sendo bem determinado de que o GH tem ação também, como tecido-alvo, no sistema nervoso central (SNC), possuindo um papel tão amplo quanto importante na regulação de inúmeros processos metabólicos (Nyberg, 2000; Donato e col., 2021).

Para que isso ocorra, o GH deve retornar para o SNC. Logo, foi identificado que existe uma grande distribuição de neurônios em diversas regiões do cérebro que respondem a estímulos do GH e que inclusive possuem GHR (Burton e col., 1992; Nyberg, 2000; Kastrup e col., 2005; Donato e col., 2021). Embora ainda seja preciso um estudo mais aprofundado sobre a função do GHR em núcleos hipotalâmicos distintos, como na região da eminência mediana (ME) (estrutura do hipotálamo basal) e no terceiro ventrículo (cavidade no cérebro que é preenchida por líquido) (Figura 4). Em estudos iniciais, foi identificada a presença do GHR mRNA nas regiões do tálamo, hipocampo, região septal, amígdala e hipotálamo, e essas são regiões que além de regular a secreção do GH pela hipófise, também estão envolvidas no

metabolismo, na resposta ao estresse, no medo e na memória (Burton e col., 1992; Donato e col., 2021). Dessa forma, as regiões hipotalâmicas responsivas estão localizadas onde se encontram os neurônios de somatostatina, nos núcleos hipotalâmicos paraventriculares (PVH) e periventriculares (PV) (Burton e col., 1992), além do núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), núcleo dorsomedial (DMH) e núcleo ventromedial (VMN) (Furigo e col., 2017).

Figura 4: Secção coronal do cérebro (corte nos gânglios da base). Ilustração da região do terceiro ventrículo.



Fonte: Adaptado de BioRender, 2023.

O GH, além de regular sua própria liberação através de *feedback* negativo, como já mencionado acima, atua na regulação central do metabolismo de forma muito mais complexa e ampla. Ele tem como uma das funções um efeito orexígeno (ou seja, estimula o apetite) (Nyberg, 2000; Donato e col., 2021), estimulando, por exemplo, a expressão de NPY, peptídeo relacionado agouti (AgRP), neurônios AgRP, proopiomelanocortina (POMC) e GHRH nos neurônios do ARH (Zhong e col., 2013; Furigo e col., 2019; Donato e col., 2021). Ele também regula a ingestão de alimentos, através dos neurônios colinérgicos da região do ARH e DMH, estimulando a expressão nos

neurônios de colina acetiltransferase (ChAT), que por sua vez co-expressa POMC no próprio ARH e tirosina hidroxilase (TH) nos núcleos PVH (Meister e col., 2006; Herman e col., 2016; Quaresma e col., 2020).

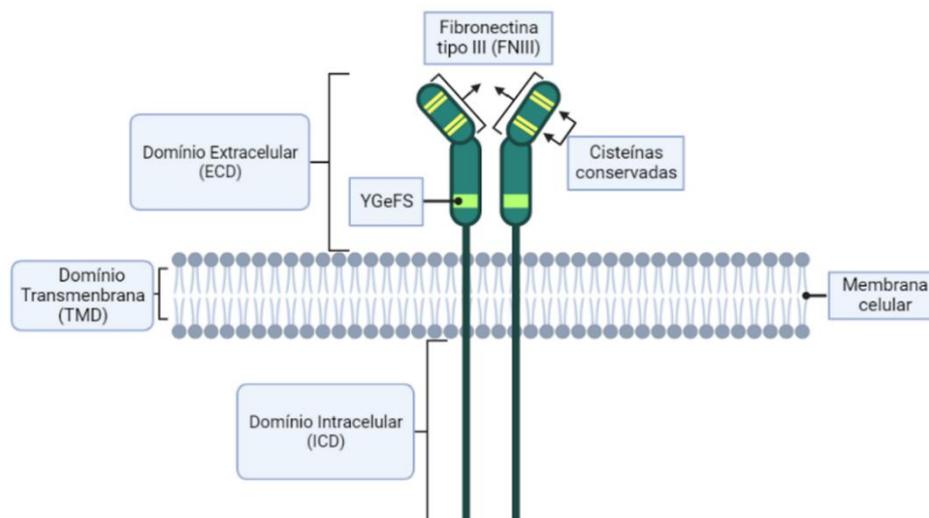
O GH também atua na modulação de insulina e na homeostase da glicose, agindo em células que expressam o receptor de leptina (LepR). Observa-se que a ablação do GHR nessas células sensibiliza a insulina hepática, atuando também no núcleo motor dorsal do vago (DMX) que regula a secreção de hormônios pancreáticos. Além disso, os neurônios no VMN tem como resposta direta do GH expressando fator esteroideogênico 1 (SF1) e Lep, ambos muito importantes na regulação da hipoglicemia. A sinalização do GHR também adapta o organismo ao exercício aeróbico, a partir de respostas glicêmicas (Donato e col., 2021).

Dessa forma, pode-se observar a amplitude da atuação do GH no SNC, e a importância da continuidade desse estudo, afim de destacar uma melhor avaliação da expressão do GH e do GHR nesse sistema.

3.3. Receptor do hormônio de crescimento

O receptor do hormônio de crescimento (GHR) faz parte da família de receptores de citocinas classe 1, que compõe mais de 30 receptores, como por exemplo o receptor de prolactina (PRLR), receptor de eritropoietina (EPOR), receptor de algumas interleucinas, entre outros. O GHR é um homodímero de 638 aminoácidos, com domínio de homologia do receptor de citocina (CRH) (Waters & Brooks, 2015). É um receptor que possui um domínio transmembrânico de passagem única (TMD) e um domínio intracelular citoplasmático (ICD). Ele tem uma sequência de YgeFs que tem como função a estabilidade e expressão do receptor (Waters & Brooks, 2015; Dehkoda, 2018) (Figura 5).

Figura 5: Ilustração da organização do domínio do GHR.



Fonte: Adaptado de Dekhoda, 2018.

A ativação do receptor ocorre quando o GH se liga em duas moléculas de GHR, no domínio extracelular, gerando uma dimerização do receptor, para assim, induzir a transdução de sinal intracelular (Cunningham e col., 1991). Para que isso ocorra, o GH se liga inicialmente no sítio de ligação do primeiro receptor, sítio 1, e em seguida se liga no sítio de ligação do segundo receptor, sítio 2 (Cunningham e col., 1991; Wells, 1996; Fisker, 2006).

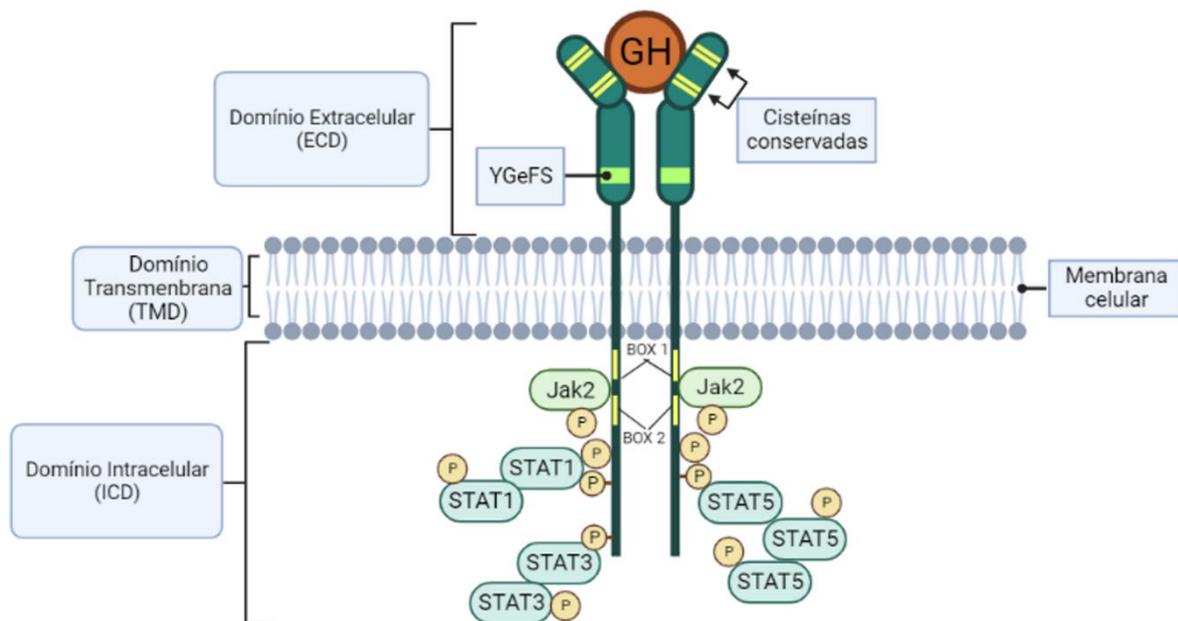
Dentro do domínio intracelular dos receptores, existem duas sequências denominadas BOX1, que é rica em prolina e está próxima da membrana celular, e a BOX2, que possui resíduos ácidos e aromáticos que está próxima da C-terminal da BOX1 (Waters & Brooks, 2015; Dekhoda, 2018).

Com a dimerização, ocorre uma mudança conformacional dos receptores, nesse momento os domínios transmembrânicos fazem uma transição de interação paralela para uma interação cruzada. Logo após, ocorre uma ativação da molécula Janus quinase cognata (JAK), sendo que o Janus quinase cognata 2 (JAK2) é o único membro da família JAK que é ativado no GHR. Em seguida, o JAK2 se liga no BOX1 e BOX2 (sequências que atuam como sítios de ligação do JAK). Em seguida, o JAK2 fosforila resíduos de tirosina no domínio intracelular. Dessa forma, ocorre uma cascata de sinalização e ligação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 5

(STAT5a e STAT5b) por várias citosinas (Waters & Brooks, 2015; Dekhoda, 2018) (Figura 6). O JAK2 também ativa STAT1 e STAT3, porém a STAT5 é o fator predominante proporcionando proliferação e ação celular e na regulação de GH através de genes-alvo relacionados ao metabolismo e crescimento corporal (Waters & Brooks, 2015). Já se sabe que o STAT5b tem como papel principal de transcrição mediado pelo GH, através de diversos genes-alvo terem sido identificados e caracterizados, porém ainda se faz necessário mais estudos (Rotwein, 2020).

No SNC o pSTAT5 foi identificado apenas nos neurônios, em estruturas que são envolvidas na regulação do comportamento, da emoção, de informações límbicas, do hipocampo, do monitoramento de valência e amígdala (Donato e col., 2021).

Figura 6: Ilustração da ativação do GHR a partir da ligação e dimerização do hormônio de crescimento.

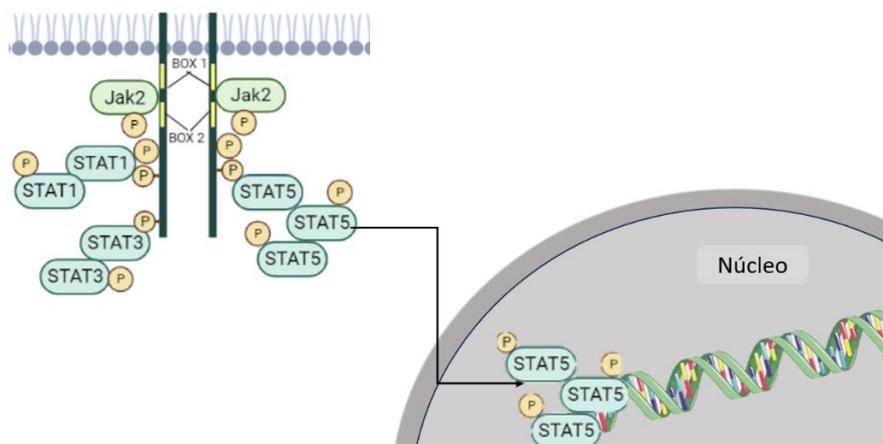


Fonte: Adaptado de Fernández-Pérez et al., 2013; Dekhoda, 2018.

Após a ativação do JAK2 e consequentemente da fosforilação das tirosinas, os dímeros de STAT5 se ligam a esses resíduos de tirosina e posteriormente o próprio STAT5 é fosforilado pelo JAK2, gerando dímeros

ativos de STAT5 para serem transportados para o núcleo. Uma vez no núcleo, a STAT5 se liga no DNA e atua como fator de transcrição (Levy & Darnell, 2002; Henninghausen & Robinson, 2008; Dekhoda, 2018; Rotwein, 2020) (Figura 7).

Figura 7: Ilustração da translocação de STAT5 para o núcleo, ligando-se no DNA.



Fonte: Adaptado de Dekhoda, 2018.

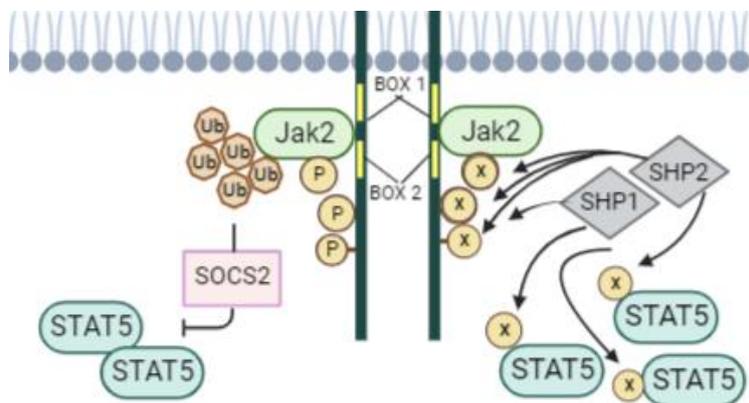
Além da ativação do receptor, a regulação negativa do mesmo é muito importante, para manter um funcionamento correto e não levar a doenças. Os três principais reguladores negativos da sinalização JAK-STAT são: proteína supressora da sinalização de citocina (SOCS), proteína tirosina fosfatase (PTP) e a proteína inibidora de STAT ativada (PIAS) (Dekhoda, 2018).

Os genes SOCS são traduzidos a partir da ativação induzida por citocinas como forma de *feedback* negativo da sinalização JAK-STAT. As proteínas SOCS podem atuar de quatro formas diferentes, quando ligadas a JAKs ou ao receptor, podendo cessar a capacidade de quinase da JAK, ou então impedir que a JAK se ligue ao receptor, e assim parar a ligação de STATs para com o receptor, e mediar a ubiquitinação de JAK e STAT para posteriormente ocorrer a degradação proteossômica (Linossi e col., 2013; Chu e col., 2020). A família SOCS possui 8 membros (SOCA1-7 e CIS), e o SOCS1-3 e CIS são os que regulam negativamente a sinalização através do GH, sendo o SOCS2 o principal regulador (Dekhoda, 2018) (Figura 8).

As PTP tem como atuação a inibição da sinalização por desfosforilação de seu substrato, e existe quatro grupos, os PTPs não receptores (SHP1 e SHP2), sendo os principais reguladores desse grupo de proteína, temos também a tirosina fosfatase receptora (CD45), fosfatase de dupla especificidade, e fosfatase de baixa especificidade. As PTPs atuam tanto nos JAKs quanto nas STATs, apenas dependendo da sua localização, por exemplo, se estiverem localizadas na membrana celular ou no citoplasma irão afetar os JAKs, porém se estiverem localizadas no núcleo irão afetar as STATs (Neel e col., 1997; Xu & Fisher, 2012; Welsh e col, 2021) (Figura 8).

As PIAS, assim como as SOCS, também são traduzidas a partir da ativação induzida por citocinas como forma de feedback negativo da sinalização JAK-STAT. A família das PIAS consistem em 7 membros, e podem afetar a sinalização de três formas diferentes, inibindo a atividade de ligação das STATs no DNA, modificar o substrato (SUMOilação), e recrutar outros co-repressores transcricionais (Dehkhoda, 2018).

Figura 8: Ilustração da regulação negativa da sinalização do GHR.



Fonte: Adaptado de Dehkhoda, 2018.

Além da dimerização e sinalização, o complexo GH/GHR pode ser internalizado nas células a partir de diferentes vias de internalização, mediado pelo próprio GHR (Lobie e col., 1999; Kerkhof e col., 2001; Perret-Vivancos e col., 2006). Dessa forma, através das vias de endocitose mediada por caveolina e clatrina, esse complexo pode ser direcionado para diversas regiões

da célula, sendo entregues para lisossomos, mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Lobie e col., 1994; Hai-Nan e col., 2019). Além disso, o GH/GHR também pode ser levado até o núcleo celular (Hainan e col., 2018), indicando que o complexo GH/GHR pode realizar um papel fisiológico diretamente, e não apenas na membrana plasmática. Sabe-se que a internalização do complexo GH/GHR tende a passar pelo processo de reciclagem para a superfície da célula e assim iniciar o próximo ciclo de sinalização, como também passar pelo processo de degradação no lisossomo (Hainan e col., 2018). Também foi identificado que a atuação do complexo no núcleo é de proliferação celular (Hainan e col., 2018). Já a internalização sendo alvo a mitocôndria, promove o estímulo de consumo de oxigênio e respiração celular (Perret-Vivancos e col., 2006).

No caso do transporte do GH para o SNC é importante entender a estrutura pelo qual o mesmo precisa passar. A barreira hematoencefálica (BHE) compreende vasos do SNC que possuem várias propriedades adicionais para regular o movimento de moléculas, íons e células entre sangue e SNC, para manter a homeostase do mesmo. Ela é composta por duas principais células, as células endoteliais e as células murais, mas possui uma membrana basal e matriz extracelular com astrócitos, células neurais e gliais (Daneman & Prat, 2015). Para que uma molécula grande atravesse a BHE ocorre um processo chamado transcitose, sendo um processo saturável, ativo e dependente de pH e temperatura, e a mesma pode ocorrer mediada por receptor ou por absorção (Scherrmann., 2002; Abbott e col., 2010; Patel & Page, 2017). Já foi identificado o GHR expresso na BHE, e seu papel está vinculado com o crescimento da parede do vaso. Entretanto, a ação no transporte do GH para o SNC ainda não está clara e precisa de estudos mais aprofundados.

3.4. Hormônio de crescimento de camundongo

O hormônio de crescimento murino (mGH), um hormônio somatotrópico ou somatotropina, é uma proteína monomérica, ou seja, formado por uma única cadeia polipeptídica. É uma proteína de 21,8 kDa que consiste em 190

aminoácidos (Figura 9), e possui o ponto isoelétrico (pI) (indica o potencial hidrogeniônico, pH, em que a molécula se encontra neutra), no valor de 6,37.

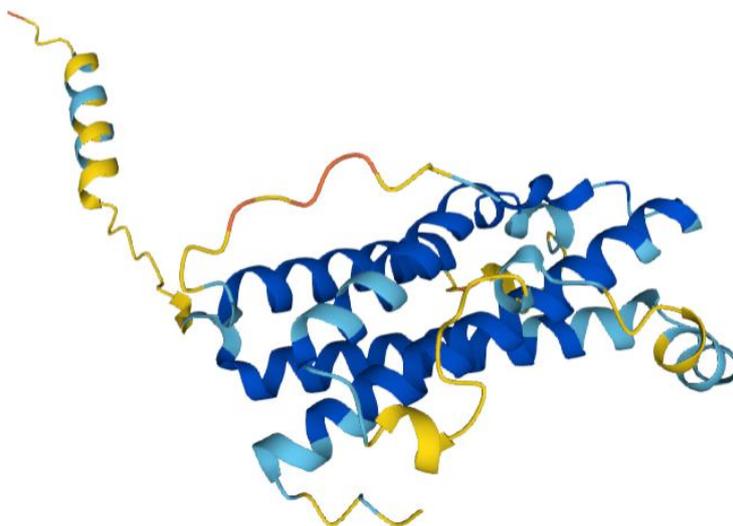
Figura 9: Ilustração da sequência de mGH: nucleotídeos e respectivos aminoácidos conforme descrito no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone (GenBank Accession number: NM_008117.3). O peptídeo sinal de 26 aminoácidos está sublinhado em amarelo.

		>mGH original cDNA																	
1		ATG	GCT	ACA	GAC	TCT	CGG	ACC	TCC	TGG	CTC	CTG	ACC	GTC	AGC	CTG	45		
1		<u>M</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	15		
46		CTC	TGC	CTG	CTC	TGG	CCT	CAG	GAG	GCT	AGT	GCT	TTT	CCC	GCC	ATG	90		
16		<u>L</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	F	P	A	M	30		
91		CCC	TTG	TCC	AGT	CTG	TTT	TCT	AAT	GCT	GTG	CTC	CGA	GCC	CAG	CAC	135		
31		P	L	S	S	L	F	S	N	A	V	L	R	A	Q	H	45		
136		CTG	CAC	CAG	CTG	GCT	GCT	GAC	ACC	TAC	AAA	GAG	TTC	GAG	CGT	GCC	180		
46		L	H	Q	L	A	A	D	T	Y	K	E	F	E	R	A	60		
181		TAC	ATT	CCC	GAG	GGA	CAG	CGC	TAT	TCC	ATT	CAG	AAT	GCC	CAG	GCT	225		
61		Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	I	Q	N	A	Q	A	75		
226		GCT	TTC	TGC	TTC	TCA	GAG	ACC	ATC	CCG	GCC	CCC	ACA	GGC	AAG	GAG	270		
76		A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	K	E	90		
271		GAG	GCC	CAG	CAG	AGA	ACC	GAC	ATG	GAA	TTG	CTT	CGC	TTC	TCG	CTG	315		
91		E	A	Q	Q	R	T	D	M	E	L	L	R	F	S	L	105		
316		CTG	CTC	ATC	CAG	TCA	TGG	CTG	GGG	CCC	GTG	CAG	TTC	CTC	AGC	AGG	360		
106		L	L	I	Q	S	W	L	G	P	V	Q	F	L	S	R	120		
361		ATT	TTC	ACC	AAC	AGC	CTG	ATG	TTC	GGC	ACC	TCG	GAC	CGT	GTC	TAT	405		
121		I	F	T	N	S	L	M	F	G	T	S	D	R	V	Y	135		
406		GAG	AAA	CTG	AAG	GAC	CTG	GAA	GAG	<u>GGC</u>	ATC	CAG	GCT	CTG	ATG	CAG	450		
136		E	K	L	K	D	L	E	E	<u>G</u>	I	Q	A	L	M	Q	150		
451		GAG	CTG	GAA	GAT	GGC	AGC	CCC	CGT	GTT	GGG	CAG	ATC	CTC	AAG	CAA	495		
151		E	L	E	D	G	S	P	R	V	G	Q	I	L	K	Q	165		
496		ACC	TAT	GAC	AAG	TTT	GAC	GCC	AAC	ATG	CGC	AGC	GAC	GAC	GCG	CTG	540		
166		T	Y	D	K	F	D	A	N	M	R	S	D	D	A	L	180		
541		CTC	AAA	AAC	TAT	GGG	CTG	CTC	TCC	TGC	TTC	AAG	AAG	GAC	CTG	CAC	585		
181		L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	195		
586		AAA	GCG	GAG	ACC	TAC	CTG	CGG	GTC	ATG	AAG	TGT	CGC	CGC	TTT	GTG	630		
196		K	A	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	R	F	V	210		
631		GAA	AGC	AGC	TGT	GCC	TTC	TAG	651										
211		E	S	S	C	A	F	*	217										

Fonte: própria autora (*Mus musculus* Growth Hormone - GenBank Accession number: NM_008117.3).

O mGH contém quatro resíduos de cisteína, duas ligações dissulfeto e quatro hélices, assim como os GH humano, bovino, ovino, suíno e de enguia (Kopchick e col., 2002; Fradkin e Board, 2010) (Figura 10).

Figura 10: Ilustração da molécula da proteína mGH, produzida por AlphaFold.



Fonte: UniProt, produzida por AlphaFold. Site: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06880/entry>

A ação do GH em processos fisiológicos e na homeostase do organismo é muito parecida quando comparamos o mesmo em espécies diferentes. Porém, sua estrutura, composição e funções podem se diferenciar entre espécies (Cattini e col., 2018). Por exemplo, existe algumas diferenças na sequência da estrutura cromossômica para produção e regulação, além de diferenças de aminoácidos entre mGH e o hormônio de crescimento humano (hGH) (Tabela 1) (Cattini e col., 2018).

Tabela 1: Comparação de número de aminoácidos, peso molecular e valor de pI entre a proteína mGH e a proteína hGH.

Protein: mGH sem SP			Protein: hGH sem SP		
Length = 190 amino acids			Length = 191 amino acids		
Molecular Weight = 21839,87 Da			Molecular Weight = 22127,90 Da		
pI = 6,37			pI = 5,27		
Amino acid	Number	Mol %	Amino acid	Number	Mol %
Ala A	16	8,42	Ala A	7	3,66
Cys C	4	2,11	Cys C	4	2,09
Asp D	10	5,26	Asp D	11	5,76
Glu E	14	7,37	Glu E	14	7,33
Phe F	13	6,84	Phe F	13	6,81
Gly G	8	4,21	Gly G	8	4,19
His H	3	1,58	His H	3	1,57
Ile I	7	3,68	Ile I	8	4,19
Lys K	11	5,79	Lys K	9	4,71
Leu L	24	12,63	Leu L	26	13,61
Met M	6	3,16	Met M	3	1,57
Asn N	5	2,63	Asn N	9	4,71
Pro P	7	3,68	Pro P	8	4,19
Gln Q	13	6,84	Gln Q	13	6,81
Arg R	12	6,32	Arg R	11	5,76
Ser S	15	7,89	Ser S	18	9,42
Thr T	8	4,21	Thr T	10	5,24
Val V	6	3,16	Val V	7	3,66
Trp W	1	0,53	Trp W	1	0,52
Tyr Y	7	3,68	Tyr Y	8	4,19

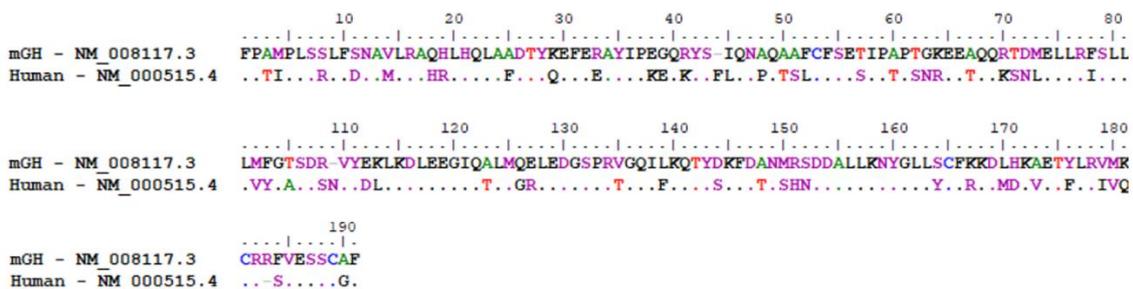
Fonte: própria autora (BioEdit).

Para estudos desse hormônio, têm sido cada vez mais utilizados os animais murinos (ratos e camundongos) devido às semelhanças anatômicas, fisiológicas e genômica. E já se sabe que a diferença entre as propriedades biológicas dos GHs, também diz respeito às ligações de seus respectivos receptores (Wallis, 1980; Cattini e col., 2018). Existem evidências que o hGH se liga tanto ao GHR quanto no receptor de prolactina (PRLR), no entanto o mGH e hormônio de crescimento de rato (rGH) se ligam apenas ao GHR (Wells e col., 1993; Goffin & Kelly, 1996; Mode e col., 1996; Cattini e col., 2018). Outra diferença é que o hGH consegue se ligar em receptores de diversas espécies, porém é o único a gerar uma resposta biológica funcional ao se ligar no receptor humano (Souza e col., 1995; Fisker, 2006).

A sequência de aminoácidos do mGH tem uma semelhança de apenas 60% em comparação com a sequência do hGH (Figura 11), logo um tratamento com administração a longo prazo de hGH em animais murinos, pode resultar

em respostas imunes inatas, tendo evidência que o tratamento a curto prazo é tolerável (Fradkin e Boand, 2010).

Figura 11: Ilustração do alinhamento de aminoácidos entre mGH e hGH, sem o peptídeo sinal.



Fonte: própria autora (BioEdit).

Essas informações nos indicam que realizar estudos em animais murinos com hGH se torna, de certa forma, inviável, demonstrando uma necessidade de se realizar estudos com modelos de hormônios homólogos (espécie-específico).

3.5. Antagonista de receptor do hormônio de crescimento de camundongo (G118R-mGH)

Um antagonista é uma molécula que impede a execução da ação de um agonista, não desempenhando nenhum efeito adicional, e podem ser divididos em duas classes: antagonista de receptor e antagonista sem receptor (Kopchick e col., 2002; Golan e col., 2010). Os antagonistas sem receptor são vistos como antagonistas químicos, que inativam o agonista, por exemplo, neutralizando quimicamente o mesmo, e antagonistas fisiológicos, que produzem um efeito contrário do provocado pelo agonista (Golan e col., 2010). Já os antagonistas de receptor conseguem se ligar aos sítios ativos do receptor, impedindo a ligação do agonista, ou se ligar em sítios alostéricos do receptor, alterando a propriedade do local da ligação do agonista ou impedindo

a alteração da conformação do receptor para a sua ativação (Golan e col., 2010).

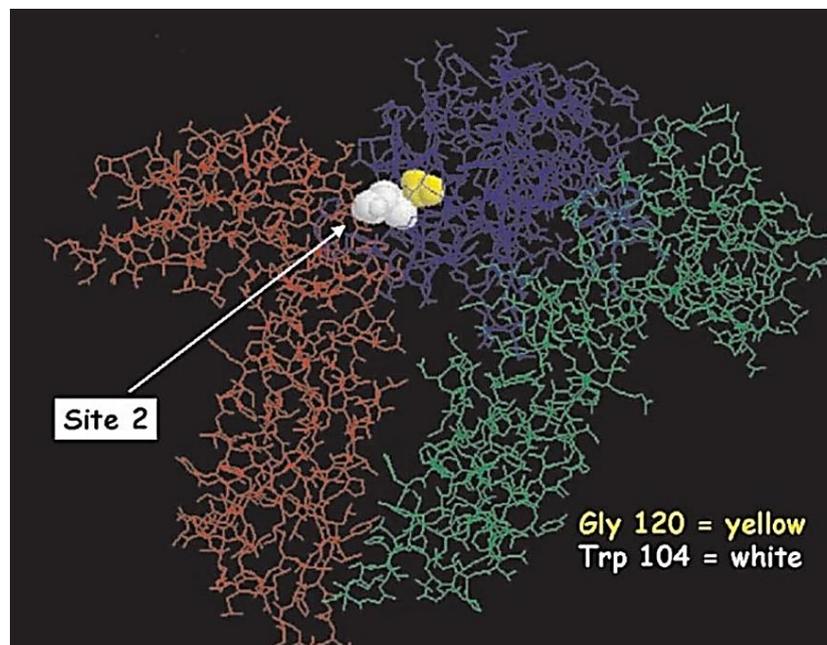
O antagonista de receptor competitivo consegue se ligar de forma reversível no sítio ativo do receptor, não estimulando a conformação necessária para a ativação do mesmo, e assim consegue bloquear a ligação do agonista (Golan e col., 2010).

Pensando nisso, a molécula de antagonista de receptor de GH (GHA) foi descoberta para competir com o GH e impedir a dimerização necessária para a operação do GHR, e assim impedir a cascata de sinalização que ocorreria posteriormente (Chen e col., 1991; Parkinson & Trainer, 2000; Kopchick e col., 2002). A glicina, na terceira hélice da proteína, foi apontada como um aminoácido importante para a atividade biológica do hormônio. Foi observado que se houvesse uma substituição da glicina por uma arginina ou lisina, a proteína se tornaria um antagonista de GH (Chen e col., 1991; Kopchick e col., 2002).

Para o início do estudo com antagonistas, houve a necessidade de entender a região específica da molécula de GH envolvida na ligação com o GHR. Foram identificados como os principais aminoácidos do contato do GH com GHR o triptofano-104 e o triptofano-169 (Cunningham & Wells, 1989; Bass e col., 1991; Kopchick e col., 2002). Entretanto, foi observado que os aminoácidos 109-126 do hormônio de crescimento bovino (bGH) e 110-127 do hGH, da hélice 3 da proteína de GH, não formam uma hélice anfifílica (possui região hidrofílica e região hidrofóbica), porém possuem atividade promotora de crescimento baixa e significativa (Hara e col., 1978). Dessa forma, criou-se uma hipótese de que se houvesse uma hélice 3 anfifílica perfeita resultaria em um modelo de GH análogo com maior atividade biológica (Kopchick e col., 2002). Logo, estudos aprofundados mostraram que a glicina na posição 119 bGH e glicina na posição 120 de hGH são vitais para a atividade promotora de crescimento da proteína, e que a alteração desse aminoácido reverteria a ação da proteína para um supressor/antagonista do GH (Chen e col., 1990; Okada e col., 1992; Xu e col., 1995; Kopchick e col., 2002).

Foi demonstrado que para ocorrer a ação do GHR, é preciso que forme um complexo heterotrimérico (GHR-GH-GHR), ou seja, uma única molécula de GH se liga em duas moléculas de receptor. Além disso, foi revelado, em modelos produzidos por cristalografia, que a região da glicina na terceira hélice, forma uma “fenda”, e que nesse local a glicina é intimamente ligada com o triptofano-104 da segunda molécula de receptor (sítio 2), para assim, se encaixar e formar o complexo (De Vos e col., 1992). Logo, a ligação da molécula de GH para com o GHR ocorre com a captura do GH pela primeira molécula de receptor (sítio 1), sendo uma ligação de alta afinidade, através da alça grande e da quarta hélice do GH, seguido pela ligação da segunda molécula de receptor (sítio 2), sendo uma ligação de baixa afinidade, através da primeira e terceira hélice do GH (Figura 12) (Chen e col., 1990; De Vos e col., 1992; Kopchick e col., 2002).

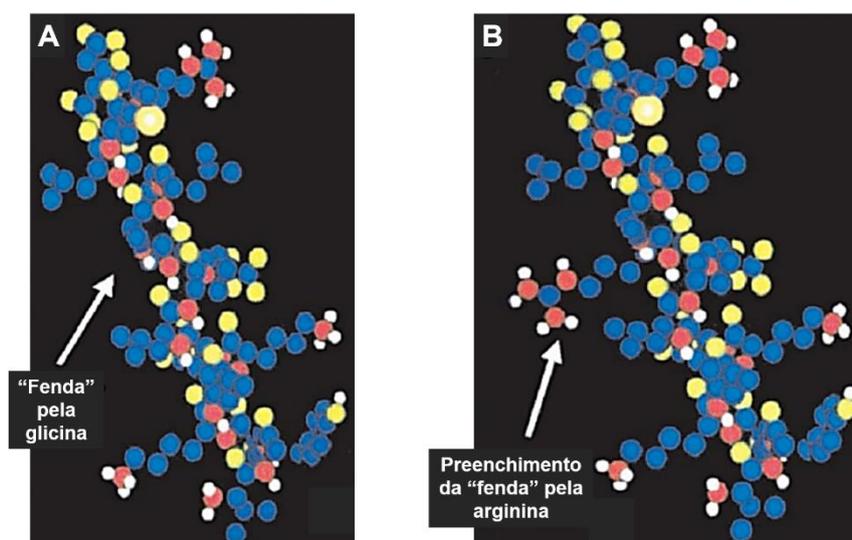
Figura 12: Ilustração da cristalografia do complexo heterotrimérico. Molécula de hGH em azul e duas moléculas do GHR (domínio extracelular) em vermelho e verde. A ligação da glicina-120 hGH, em amarelo, com o triptofano-104 do hGHR, em branco, estão sendo indicados com a seta.



Fonte: Kopchick e col., 2002.

Além desses resultados, mais estudos mostraram uma resposta positiva de antagonismo se substituir a glicina por arginina (De Vos e col., 1992; Parkinson & Trainer, 2000; Kopchick e col., 2002). Para ocorrer a ação antagonista da molécula do GH, foi demonstrado um modelo de preenchimento parcial da “fenda”. Para isso, foi elaborada a substituição do aminoácido glicina para o aminoácido arginina, e dessa forma foi evidenciado que a “fenda” foi preenchida impedindo que ocorra a interação adequada da molécula de GH com a segunda molécula de receptor (sítio 2) (Figura 13) (Chen e col., 1990; Kopchick e col., 2002).

Figura 13: Ilustração do preenchimento parcial da “fenda” com a substituição de glicina para arginina na terceira hélice de bGH. (A) a seta indica o local da “fenda” devido à glicina. (B) a seta indica o preenchimento da “fenda” pela arginina.



Fonte: Kopchick e col., 2002.

Nos estudos mais aprofundados *in vivo* percebeu-se que o antagonista de hGH (G120R) era ineficaz em roedores (Mode e col., 1996; Kopchick e col., 2002; Kopchick e col., 2014), ou seja, não consegue antagonizar a ação promotora de crescimento do GH, além disso mostrou que o mesmo tem um efeito agonista, em roedores, com uma possível ligação no receptor de prolactina (PRLR) (Mode e col., 1996), o que nos leva a entender a importância de produzir e trabalhar com modelos de hormônios e antagonistas homólogos.

Dessa forma, com base nessas informações e com uma frequência relevante de uso de camundongos em pesquisas, realizamos e investigamos uma substituição de glicina por arginina na posição 118, da proteína de GH de camundongo (G118R-mGH), para um possível potencial antagonista de receptor, localizado na região conservada do GH, para assim conseguir trabalhar com modelo homólogo de antagonista (Figura 14).

Figura 14: Ilustração da sequência de mGH, nucleotídeos e respectivos aminoácidos obtidos no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone (GenBank Accession number: NM_008117.3). Na posição do aminoácido 118, o códon para glicina “GGC” (MM = 75,07 g/mol) foi substituído pelo códon para arginina “CGC” (MM = 174,2 g/mol), da proteína madura (190 aa total).

1	ATG	GCT	ACA	GAC	TCT	CGG	ACC	TCC	TGG	CTC	CTG	ACC	GTC	AGC	CTG	45
1	M	A	T	D	S	R	T	S	W	L	L	T	V	S	L	15
46	CTC	TGC	CTG	CTC	TGG	CCT	CAG	GAG	GCT	AGT	GCT	TTT	CCC	GCC	ATG	90
16	L	C	L	L	W	P	Q	E	A	S	A	F	P	A	M	30
91	CCC	TTG	TCC	AGT	CTG	TTT	TCT	AAT	GCT	GTG	CTC	CGA	GCC	CAG	CAC	135
31	P	L	S	S	L	F	S	N	A	V	L	R	A	Q	H	45
136	CTG	CAC	CAG	CTG	GCT	GCT	GAC	ACC	TAC	AAA	GAG	TTC	GAG	CGT	GCC	180
46	L	H	Q	L	A	A	D	T	Y	K	E	F	E	R	A	60
181	TAC	ATT	CCC	GAG	GGA	CAG	CGC	TAT	TCC	ATT	CAG	AAT	GCC	CAG	GCT	225
61	Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	I	Q	N	A	Q	A	75
226	GCT	TTC	TGC	TTC	TCA	GAG	ACC	ATC	CCG	GCC	CCC	ACA	GGC	AAG	GAG	270
76	A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	K	E	90
271	GAG	GCC	CAG	CAG	AGA	ACC	GAC	ATG	GAA	TTG	CTT	CGC	TTC	TCG	CTG	315
91	E	A	Q	Q	R	T	D	M	E	L	L	R	F	S	L	105
316	CTG	CTC	ATC	CAG	TCA	TGG	CTG	GGG	CCC	GTG	CAG	TTC	CTC	AGC	AGG	360
106	L	L	I	Q	S	W	L	G	P	V	Q	F	L	S	R	120
361	ATT	TTC	ACC	AAC	AGC	CTG	ATG	TTC	GGC	ACC	TCG	GAC	CGT	GTC	TAT	405
121	I	F	T	N	S	L	M	F	G	T	S	D	R	V	Y	135
406	GAG	AAA	CTG	AAG	GAC	CTG	GAA	GAG	CGC	ATC	CAG	GCT	CTG	ATG	CAG	450
136	E	K	L	K	D	L	E	E	R	I	Q	A	L	M	Q	150
451	GAG	CTG	GAA	GAT	GGC	AGC	CCC	CGT	GTT	GGG	CAG	ATC	CTC	AAG	CAA	495
151	E	L	E	D	G	S	P	R	V	G	Q	I	L	K	Q	165
496	ACC	TAT	GAC	AAG	TTT	GAC	GCC	AAC	ATG	CGC	AGC	GAC	GAC	GCG	CTG	540
166	T	Y	D	K	F	D	A	N	M	R	S	D	D	A	L	180
541	CTC	AAA	AAC	TAT	GGG	CTG	CTC	TCC	TGC	TTC	AAG	AAG	GAC	CTG	CAC	585
181	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	195
586	AAA	GCG	GAG	ACC	TAC	CTG	CGG	GTC	ATG	AAG	TGT	CGC	CGC	TTT	GTG	630
196	K	A	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	R	F	V	210
631	GAA	AGC	AGC	TGT	GCC	TTC	TAG									651
211	E	S	S	C	A	F	*									

Fonte: própria autora (*Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3)).

3.6. Doenças relacionadas ao hormônio de crescimento

A anormalidade na produção e liberação de GH pode resultar em doenças para indivíduos, podendo estar presente tanto no nascimento quanto em qualquer momento da vida. Dessa forma podemos destacar a fisiopatologia tanto da deficiência quanto do excesso de GH.

A deficiência de GH pode ocorrer de três formas, a insensibilidade ao GH, a deficiência secundária e a deficiência terciária (Golan e col., 2010).

Na insensibilidade ao GH, a adeno-hipófise secreta normalmente o hormônio, porém no fígado não ocorre a produção do IGF-1, e isso faz com que não ocorra o *feedback* negativo pelo eixo GH-IGF-1 e assim não inibe a liberação de mais GH na circulação, resultando em um nível plasmático excessivo de GH. Na deficiência secundária sucede uma insuficiência hipofisária resultando na falta de liberação do GH na circulação, e com seus níveis baixos não acontece a produção do IGF-1. Na deficiência terciária, sendo ela a mais comum, o hipotálamo não produz GHRH, o que resulta na ausência da liberação do GH na circulação, e como consequência também não existirá o estímulo da produção do IGF-1 (Golan e col., 2010).

O nanismo é o exemplo de anomalia mais conhecida referente à deficiência de GH. É resultado da deficiência generalizada da adeno-hipófise. Normalmente todas as partes físicas do corpo se desenvolvem, porém de uma forma muito reduzida (Golan e col., 2010; Guyton & Hall, 2011). O pan-hipopituitarismo, é resultado de uma secreção reduzida de todos os hormônios da adeno-hipófise, podendo ser congênita (ocorre desde o nascimento), ou aparecer em qualquer momento da vida (Guyton & Hall, 2011). Nesses casos, o tratamento acontece, em sua maioria, com a reposição do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) ou IGF-1 recombinante (rIGF-1).

Por outro lado, o excesso de GH também pode causar anomalia. Quando o GH é produzido e secretado de forma excessiva na circulação, pode

ocorrer duas formas diferentes de apresentar a doença, podendo depender se o hormônio está sendo secretado de forma excessiva antes ou depois do fechamento das epífises dos ossos (Golan e col., 2010).

No caso do gigantismo ocorre esse aumento na liberação de GH antes do fechamento das epífises, e o aumento dos níveis de IGF-1 proporciona o crescimento longitudinal exagerado dos ossos (Golan e col., 2010). Quando o aumento da liberação de GH acontece depois do fechamento das epífises, resulta no caso da acromegalia, que é conhecida como uma desfiguração somática progressiva e manifestações sistêmicas (Chanson & Salenave, 2008; Golan e col., 2010). No caso da acromegalia, pode ocorrer aumento das extremidades, aspectos faciais modificados, alterações ósseas e na pele, complicações reumatológicas, neuropatias, entre outros sintomas (Chanson & Salenave, 2008). Nessas anomalias, o tratamento é realizado com agonistas de dopamina, análogos de somatostatinas, e com o antagonista de GHR, pegvisomant (Kopchick e col., 2002; Chanson & Salenave, 2008; Kopchick e col., 2014).

3.7. Experiências do CEBIO em produção de proteínas recombinantes, expressão em células de mamíferos, bioensaio e radiomarcção

3.7.1. Produção de proteínas recombinantes e expressão em células de mamíferos

O grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia (CEBIO), no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), possui uma grande experiência e um vasto estudo no campo de proteínas recombinantes.

A técnica de DNA recombinante envolve uma série de entendimentos de pesquisas complexas em identificação de genes relacionados aos hormônios hipofisários, com a combinação de técnicas de bioinformática, a procura de bancos de dados genéticos e sequências depositadas dos genes de interesse, e biologia molecular. Dessa forma, tudo se inicia na clonagem, no caso do

presente trabalho, do mGH e G118R-mGH (com a mutação), começando com o alinhamento da sequência do cDNA e a construção dos *primers*, seguindo com a amplificação do gene com reação em cadeia polimerase (PCR), concluindo com o sequenciamento, caracterização e clonagem dos vetores de expressão.

No grupo de pesquisa do CEBIO foram utilizadas todas essas técnicas para então realizar a expressão, purificação e caracterização de proteínas recombinantes, incluindo o próprio hGH e antagonistas (Morganti e col., 1998; Oliveira e col., 1999; Soares e col., 2006; Menezes e col., 2017).

A expressão de proteínas é muito conhecida por ser realizada em células de procariontes, em particular de *Escherichia coli* (Morganti e col., 1998; Oliveira e col., 1999; Menezes e col., 2017). Porém com o avanço das tecnologias e a dinâmica das ciências outras perspectivas e metodologias foram alcançadas. A importância desse acontecimento nos leva a reforçar a complexidade das proteínas e suas modificações após a tradução. Por exemplo, as proteínas podem ser modificadas por enovelamento, glicosilação, fosforilação e outros processos. Essas modificações podem afetar a estrutura, função e estabilidade das proteínas. Apenas as células de mamíferos possuem mecanismos e etapas de enovelamento e glicosilação completos. Isso ocorre porque a organização celular de mamíferos é bem distinta da organização celular de outros organismos.

Dessa forma, a transição para a expressão em células eucariontes foi gradativa. Hoje em dia, as mais usadas para transfecção e cultivo são as de ovário de hamster chinês (CHO), sendo a principal e mais utilizada, e as de rim de embrião humano (HEK293) (Graham e col., 1977, Geisse & Voedisch, 2012; Jain e col., 2017). Outras células de mamíferos utilizadas para este fim englobam células humanas de fibrossarcoma (HT-1080), células de mieloma murino (NS0) e fibroblastos renais de hamster bebê (BHK).

O uso das células CHO no CEBIO teve início em 2000 com a produção da prolactina humana (hPRL) (Soares e col., 2000) após essa proteína já ter sido expressa também em *Escherichia coli* (Morganti e col., 1998). Pouco tempo depois foi realizada a síntese do hormônio heterodimérico TSH humano

(hTSH) (Peroni e col., 2002). Por outro lado, as células HEK293 foram utilizadas no centro no início de 2017. Com isso, foi realizada a expressão de proteínas recombinantes: hormônio folículo estimulante agFSH de pirarucu (*Arapaima gigas*) em suspensão (Sevilhano e col., 2017), hTSH em células aderidas (Sant'Ana e col., 2018) e hPRL em células aderidas (Silva e col., 2018).

A expressão de proteína em células eucariontes se inicia nos ribossomos livres e tem como destino o retículo endoplasmático (RE). O início da tradução do RNA mensageiro (mRNA) com o peptídeo sinal (que faz o direcionamento da proteína), até que o ribossomo adere ao RE e dissocia, para reciclar a organela e finalizar a tradução. É no RE onde os principais processos pós-traducionais ocorrem e constata as atribuições singulares da proteína (Nelson & Cox, 2018). As modificações pós-traducionais (MPTs) são resultados muito importantes do processo de finalização da síntese proteica, podendo acontecer fosforilação, metilação, acetilação, glicosilação, formação de pontes dissulfeto, ubiquitinação, hidroxilação, acilação, sulfatação, lipidação e sumoilação (Mann & Jensen, 2003; Alberts e col., 2010; Wilkinson & Henley, 2010).

Com o término da produção de proteína, não podemos esquecer das etapas de purificação e caracterização das mesmas, que ganhou muita relevância nos trabalhos publicados, com a determinação por cromatografia de fase reversa, purificação, caracterização de N-glicanos e determinação da atividade biológica dos hormônios produzidos por células de mamíferos (Oliveira e col., 2003; Mendonça e col., 2005; Oliveira e col., 2008; Heller e col., 2010).

3.7.2. Ensaios *in vivo*

Outra experiência que o CEBIO possui é com os ensaios *in vivo*, principalmente no campo da terapia gênica, onde se utiliza vetores plasmidiais para inserir o gene de interesse no organismo (Oliveira e col., 2010; Higuti e col., 2012; Cecchi e col., 2014; Cecchi e col., 2017; Lima e col., 2020; Jesus, 2020).

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares extracromossomais de organismos procariontes, desenvolvidos na década de 70, através da metodologia de DNA recombinante, designados para se replicar de maneira autônoma e se propagar entre bactérias por reprodução conjugada (Malajovich, 2016). Isso permitiu o mapeamento do cDNA e clonagem da primeira proteína recombinante, o GH (Malajovich, 2016).

Com a associação da administração do DNA plasmidial e a técnica de eletroporação (que permite a abertura dos poros na membrana celular, para o DNA plasmidial entrar na célula e chegar no núcleo) (Cervia e col., 2018), foram obtidos resultados de níveis sustentáveis e prolongados tanto do hGH quanto do mGH no plasma de camundongos anões imunodeficientes (lit/scid) e anões (lit/lit), e melhoras fenotípicas (Oliveira e col., 2010; Higuti e col., 2012; Cecchi e col., 2014; Cecchi e col., 2017; Lima e col., 2020). Além disso, foram realizados estudos com a utilização da técnica de injeção intraperitoneal de proteínas recombinantes, por exemplo o rec-hGH, em bioensaios (Bellini & Bartolini, 1993; Bellini e col., 2003).

Podemos ressaltar também os estudos realizados com os camundongos anões (lit/lit), imunocompetentes, muito utilizados pelo grupo. São camundongos C57BL/6J obtidos por Clarence Little em 1921, que possuem uma mutação que confere o nanismo, mimetizando a deficiência de hormônio de crescimento humano, sendo um modelo muito utilizado para avaliar a potência biológica do GH (Bellini & Bartolini, 1993; Oliveira e col., 2010; Higuti e col., 2012; Cecchi e col., 2014; Cecchi e col., 2017; Lima e col., 2020).

3.7.3. Radiomarcção

A radiomarcção é outra técnica conhecida pelo grupo de pesquisa do CEBIO, e que recentemente também está relacionada a uma parceria do CEBIO com o Centro de Radiofarmácia do IPEN. Foram realizadas publicações de radioiodação e de radioimunoensaio (Ribela e col., 1993), e testes da influência da cloramina T (CLT) (Bartolini & Ribela, 1986), ambos utilizando hGH.

Figura 16: Ilustração da radioiodação com iodeto de sódio (Na^{131}I) e a introdução dos átomos de ^{131}I no resíduo de tirosina, no anel aromático de hidroxila, provocando uma troca eletrolítica por oxidação da CLT.



Fonte: Andrews e col., 1992.

Além disso, pesquisa do CEBIO mostrou que a radioiodação de até 2,7 átomos/molécula não compromete de forma significativa a atividade imunológica e biológica do GH (Bartolini & Ribela, 1986). Também foi evidenciado que o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ não provoca o efeito de agregação, indicando que a CLT é a principal responsável pela modificação da molécula, no sentido da modificação do peso molecular e na perda da atividade imunológica e biológica, porém vale ressaltar que o GH se mostrou estável na reação com CLT (Krohn e col., 1972; Bartolini & Ribela, 1986).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Plasmídeos pcDNA 3.4-TOPO-mGH e 3.4- TOPO-G118R-mGH

4.1.1. Construção dos plasmídeos pcDNA 3.4-TOPO-mGH e G118R-mGH

Foi construído um vetor para a expressão do mGH e outro para o G118R-mGH. Nessas construções foram inseridos no pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®) o cDNA referente às proteínas de interesse, incluindo a sequência correspondente ao peptídeo sinal original, com 26 aminoácidos (aa). O cDNA correspondente ao mGH foi sintetizado por reação em cadeia da polimerase (PCR), com o protocolo de REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, EUA), adicionando a sequência de Kozak (G/ANNATG, em seguida a sequência do peptídeo sinal, o cDNA correspondente e o códon de parada (TAG).

Os *primers* utilizados foram:

Forward mGH: 5' GCA ATG GCT ACA GAC TCT CGG ACC 3'

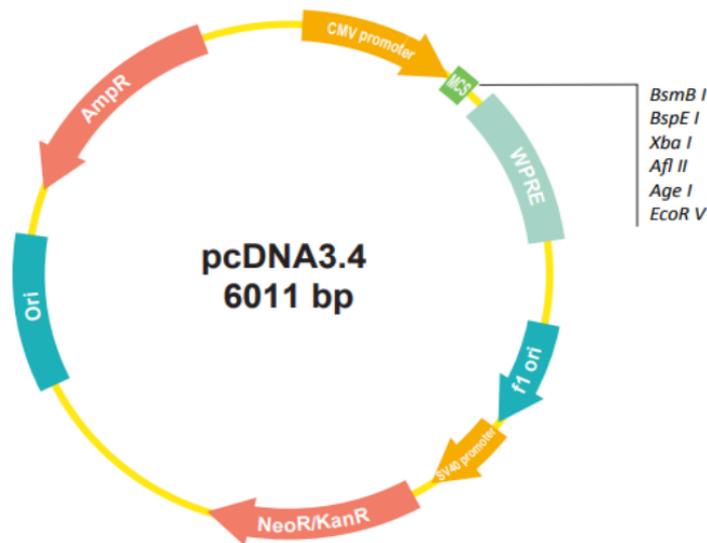
Reverse mGH: 5' CTA GAA GGC ACA GCT GCT TTC CAC 3'

As condições do termociclador (iCycler Thermal Cycler 2x48 PCR Machine, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram: 25 ciclos; desnaturação a 94 °C (1 min); anelamento a 63 °C (2 min); extensão a 72 °C (3 min).

Foi utilizado como molde o vetor pcDNA 3.1 contendo o cDNA do mGH, gentilmente doado pelo grupo de Terapia Gênica do Centro de Biotecnologia, coordenado pela Dra. Cibele Nunes Peroni.

O fragmento de PCR foi purificado do gel de agarose e a reação com o vetor pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®) (Figura 17) foi realizada segundo as instruções do fabricante.

Figura 17: Ilustração do mapa do vetor pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®). Na imagem estão destacadas suas respectivas regiões: AmpR: resistência ao antibiótico ampicilina; CMV promoter: promotor de citomegalovírus; MCS: sítio múltiplo de clonagem (local em que insere o gene de interesse), e são indicadas também as enzimas de restrição que são utilizadas para clonagem; WPRE: elemento regulatório pós-traducional de vírus de hepatite WoodChuck; F1 ori: origem de replicação de fago; SV40 promoter: região promotora de vírus vacuolante símio 40; NeoR/KanR: resistência aos antibióticos neomicina e kanamicina; Ori: origem de replicação.



Fonte: GenScript Biotech (Piscataway, NJ, EUA).

Os sequenciamentos obtidos das nossas construções foram comparados com a sequência de cDNA do NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone (GenBank Accession number: NM_008117.3).

No caso do G118R-mGH, o plasmídeo pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®) foi adquirido já com a sequência de mGH modificada (GenScript, FastBio, SP), ou seja, com o códon 118 para a glicina “GGC” substituído pelo códon da arginina “CGC”.

4.1.2. Transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α com o plasmídeo pcDNA 3.4-mGH ou pcDNA 3.4-G118R-mGH

Para realizar a transformação das bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes pelo método de choque térmico foram utilizados 100 ng de plasmídeo em tubos de 1,5 mL. A reação foi submetida a incubações alternadas: 30 minutos no gelo, 2 minutos a 37 °C, e 2 minutos no gelo. Em seguida foram adicionados 800 µL de meio LB (Luria-Bertani), submetidos a agitação de 200 rpm, a 37 °C, por 1 hora. Após este período, as bactérias foram semeadas em placa de Petri, previamente preparadas com meio luria-bertani (LB), ágar e ampicilina 0,1 mg/mL. Após incubação de 16-18h em estufa a 37 °C, foram observadas várias colônias.

Para obtenção dos plasmídeos em grande quantidade e pureza para a transfecção das células HEK293F foram realizados três midipreps seguindo o protocolo de purificação do produto comercial NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Alemanha). O protocolo consiste no inóculo de uma colônia isolada em 100 mL de meio LB com ampicilina, em agitação a 150 rpm, a 37 °C, para crescimento *overnight*.

Os plasmídeos foram quantificados por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000. Após calibrar o equipamento com água Milli-Q autoclavada, foi aplicado um microlitro da amostra (volume total = 100 µL), determinada a concentração em ng/µL, e a razão de pureza (A260/280), ou seja, quanto maior a absorbância a 260 nm (A260) em relação à absorbância a 280 nm (A280), maior é a quantidade de DNA em relação à proteína contaminante presente na amostra, devendo estar entre 1,8 e 2,0.

4.2. Produção de mGH e G118R-mGH em células HEK293F

4.2.1. Transfecção transiente em células HEK293F

Foi utilizada cultura de células de rim de embrião humano (HEK293F) em suspensão, em meio Expi293, sem antibiótico, com incubação a 37 °C, 8% CO₂ e agitação orbital de 130 rpm. Para a realização da transfecção, foi utilizado 30 mL de suspensão celular na concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL e viabilidade igual ou superior a 95%, determinadas na câmara de Neubauer, utilizando azul de tripan. A cultura foi mantida em Erlenmeyer com capacidade para 125 mL com tampa de filtro EPA. Foram adicionados 30 µg do plasmídeo e todos os reagentes do kit de transfecção (Expifectamine, enhancer 1 e 2) seguindo o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2. Análise da produção de mGH e G118R-mGH por SDS-PAGE e Western Blotting

Foram realizadas análises do meio condicionado e das frações resultantes das etapas de purificação das proteínas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com gel de separação a 15% de poliacrilamida e gel de empilhamento a 3%, em condição

não-reduzida e reduzida (Laemmli, 1970, Maniatis e col., 1989). Para a revelação foi utilizado Coomassie Brilliant Blue G-250 ou nitrato de prata (Soares e col., 2000).

Para a realização do Western Blotting, foi seguida basicamente a técnica de transferência semiseca, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-GH (1:1000) produzido em coelho e como anticorpo secundário, soro de cabra anti-IgG de coelho policlonal conjugado com HRP (1:10.000) (Signalway Antibody LLC). A revelação foi realizada utilizando-se Luminol (Millipore®) e fotodocumentador.

4.3. Caracterização e purificação do mGH e G118R-mGH

O mGH e G118R-mGH secretados no meio condicionado, sem soro, foram purificados utilizando técnicas cromatográficas de troca iônica já utilizados para purificar hGH e G120R-hGH (Oliveira e col., 1999, Menezes e col., 2017). A resina Q-Sepharose Fast Flow empacotada em coluna de vidro foi acoplada ao sistema “AKTA Purifier” (General Electric), em unidade de absorvância no comprimento de onda de 280 nm. As frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blotting. As frações que confirmaram a presença da proteína de interesse foram coletadas e analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC) para quantificação e determinação da pureza do material, por absorvância medida no comprimento de onda de 220 nm.

Além disso, foi realizada a troca de tampão, através de centrifugação em tubos de filtração com poros de 3 kDa (Amicon), de solução Tris-HCl pH 7,4 por solução salina (NaCl 9%), para uso no bioensaio.

Ainda no contexto de caracterização, as amostras foram dessalinizadas e envidas em uma concentração de 1 µg/µL, para analisar por espectrometria de massa (MALDI-TOF), técnica que usa a ionização para determinar a massa molecular da proteína. A matriz utilizada foi HCCA, em uma concentração de 10 mg/mL em meio de acetonitrila: água (50%) acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Parâmetro utilizado: Positivo linear; Faixa de Massa de Aquisição(m/z):1000-45.000 Da; Número de Pulsos do Laser: 500; Frequência

do Laser (Laser Repetition Rate): 500Hz; Ion Source Voltage 1 kV: 19,5; Ion Source Voltage2 k V: 17,95.

4.4. Bioensaio para avaliar atividade do mGH e G118R-mGH

Para o bioensaio foi utilizado o modelo de bioensaio com camundongos anões *lit/lit*, já bem estabelecido no CEBIO (Lima e col., 2020).

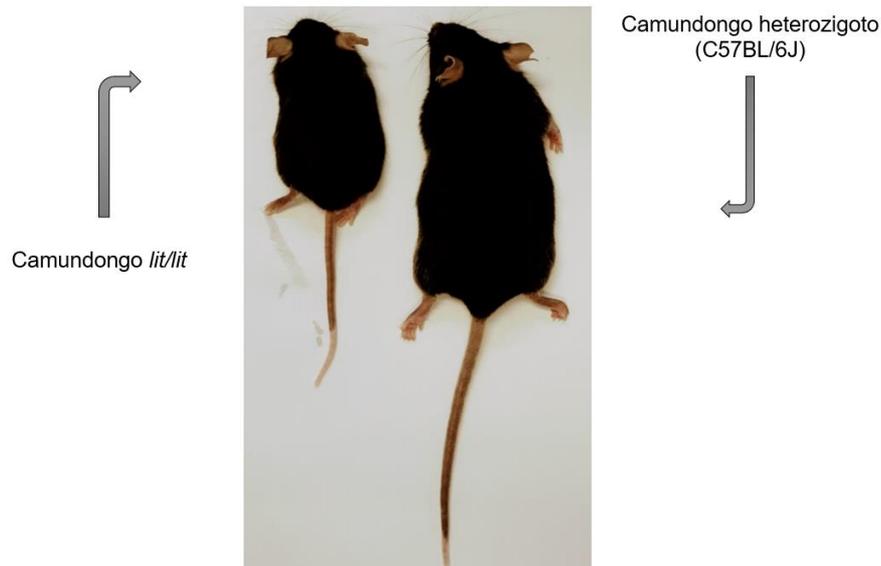
4.4.1. Camundongos anões

Utilizamos nesse estudo, camundongos C57BL/6J e camundongos anões *lit/lit*, adquiridos da The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Os camundongos C57BL/6J, isogênicos, foram utilizados como controle positivo de crescimento por constituírem o background dos *lit/lit*. Os camundongos anões *lit/lit* foram utilizados por ser um modelo biológico que mimetiza um tipo de deficiência de hormônio de crescimento em humanos. Os animais foram mantidos no biotério do CEBIO em ciclo claro/escuro de 12h/12h, temperatura controlada de 22 ± 1 °C e ração para roedores à vontade. O projeto foi aprovado pela CEUA do IPEN, número 20/22.

4.4.2. Genotipagem dos camundongos nascidos de fêmeas heterozigotas e machos anões

Todos os animais foram submetidos à genotipagem em torno de 2-3 semanas de vida para determinar se eram homozigotos, anões ou heterozigotos (Figura 18). Foram coletadas amostras da orelha dos animais para extração de DNA, utilizando REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), seguindo instruções do fabricante. A reação de PCR foi realizada conforme protocolo utilizado pelo The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Todas as reações de PCR, com quantidades padronizadas do REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Figura 18: Ilustração da comparação do tamanho corporal entre um camundongo anão (*lit/lit*) (10g) e um camundongo heterozigoto (25g).



Fonte: autor da dissertação

Sequência dos primers:

Forward: TCAGAATCTCCTCCCTCATAGGT

Reverse: CTGTGTCTGAGCCGAAGTGA (TCACTTCGGCTCAGACACAG)

As condições do termociclador (iCycler Thermal Cycler 2x48 PCR Machine, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram: 40 ciclos; desnaturação a 94 °C (30 s); anelamento a 58 °C (30 s); extensão a 72 °C (1 min).

Após a amplificação do DNA, a enzima de restrição BseG1 (Anza™) foi adicionada nas amostras (Buffer White da Thermo, enzima Fast), e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, foram submetidas imediatamente à corrida eletroforética em gel de agarose 3% em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), corado com brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultravioleta.

4.4.3. Aplicação de mGH e G118R-mGH nos camundongos

Camundongos com 22-30 dias de idade foram marcados na orelha para que cada animal pudesse ser monitorado. Foram analisados cinco grupos: (1) controle *lit/lit* salina, (2) controle hGH, (3) *lit/lit* mGH, (4) *lit/lit* G118R-mGH e (5)

controle de peso heterozigoto. É importante ressaltar que os ensaios dos grupos hGH, mGH e G118R-mGH foram realizados em momentos diferentes, porém nos três momentos tinham os grupos controle *lit/lit* salina e heterozigoto.

Camundongos controle *lit/lit* salina, inicialmente foram pesados durante dez dias, para obter um controle de peso, a partir do décimo primeiro dia receberam injeção intraperitoneal de solução salina (0,1 mL), diariamente, em uma única aplicação por dia, por um período de 10 dias. Cada animal teve o peso monitorado durante o tratamento, sendo eutanasiados duas horas após a injeção final.

Nas mesmas condições, o grupo controle hGH recebeu uma dose diária de 10 µg com solução salina (totalizando 0,1 mL), em uma única aplicação por dia, para avaliar se a proteína promoveu crescimento. Cada animal teve o peso monitorado durante o tratamento e eutanasiados duas horas após a injeção final. O grupo hGH, possuiu n = 3; controle *lit/lit* salina, possuiu n = 3; heterozigoto, possuiu n = 5.

Os grupos *lit/lit* mGH e *lit/lit* G118R-mGH, separadamente, também nas mesmas condições, receberam uma dose diária de 10 µg, de cada grupo, com solução salina (totalizando 0,1 mL), em uma única aplicação por dia, para avaliação da ação das proteínas e foram eutanasiados duas horas após a injeção final. O grupo mGH, possuiu n = 4; controle *lit/lit* salina, possuiu n = 4; heterozigoto, possuiu n = 6. No caso do grupo G118R-mGH, possuiu n = 6; controle *lit/lit* salina, possuiu n = 5; heterozigoto, possuiu n = 9.

No caso do grupo heterozigoto C57BL/6J, também foi monitorado o peso de cada animal diariamente, nesse caso não ocorreram injeções, durante todo o tratamento dos outros grupos, para um controle de crescimento, e foram eutanasiados junto com os demais grupos.

Para análise de gráficos e estatísticas, foi utilizado o software Prisma (versão 8.0.2, 263, GraphPad Prism Software Inc., Jolla, CA, EUA), com o método não-linear, usando a fórmula polinomial quadrática de segunda ordem: $Y = B_0 + B_1X - B_2X^2$.

4.5. Radiomarcção com ^{123}I e ^{131}I

O mGH e o G118R-mGH foram marcados com ^{131}I para estudo de imagem e biodistribuição, e com ^{123}I para estudo do transporte do mGH e G118R-mGH para o cérebro em diferentes tempos, pelo método de Cloramina T (CLT) (Burdon e col., 1990), em parceria com o Centro de Radiofarmácia do IPEN. Na padronização da radiomarcção foram utilizados 50 μg de mGH e G118R-mGH em 50 μL de solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) e 37 MBq de Na^{131}I e Na^{123}I . Para iniciar o processo de oxidação, foram adicionados 50 μg de CLT e incubação sob agitação orbital por 45 minutos. Para interromper a reação, foram adicionados 100 μg de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

4.5.1. Estudo de estabilidade da marcação com iodo (*in vitro*)

A estabilidade da marcação foi realizada na marcação do ^{131}I -mGH e ^{131}I -G118R-mGH. Para isso, foram realizadas quatro marcações de cada proteína (totalizando oito amostras), e cada uma foi diluída em 500 μL de soro fetal bovino. Nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas após a marcação, foram utilizados 15 μL de cada amostra para analisar a pureza radioquímica, pela técnica de cromatografia em papel ascendente, usando suporte de fitas iTLC Aluminium Sheets com metanol 85% (fase móvel). Em seguida a radioatividade foi medida por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e o fator de retenção, R_f , do produto marcado foi indicado como 0 e o iodo livre 1 ou foi medido utilizando um contador de raios gama.

4.5.2. Impactos da cloramina T no mGH e G118R-mGH

Para analisar se a reação de oxidação da CLT formou agregados e/ou formas diméricas no mGH e G118R-mGH, foram realizadas reações em condições similares à marcação, 50 μg de mGH e G118R-mGH em 50 μL de solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4), foram adicionados 50 μg de CLT e incubação sob agitação orbital por 45 minutos, e finalizando a reação com 100 μg de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), porém sem o uso do radioisótopo de iodo. Logo depois, as amostras foram analisadas por HPSEC, por

absorbância medida no comprimento de onda de 220 nm, e no gel de SDS-PAGE em condição não-reduzida e reduzida.

4.5.3. Ensaio de biodistribuição em camundongos C57BL/6J

Foi injetada, via intraperitoneal, solução salina com ^{131}I -mGH ou ^{131}I -G118R-mGH em camundongos C57BL/6J, com atividade de 0,12 MBq e 0,16 μg de hormônio por camundongo. Foram usados quatro animais, sendo dois para cada proteína. Após 45 minutos os animais foram eutanasiados. Foram coletadas amostras do sangue, pelo plexo orbital (75 μL) e os seguintes órgãos foram dissecados (fígado, coração, pulmões, baço, músculo (gastrocnêmio), osso (fêmur), estômago, intestinos, pâncreas, rins, bexiga e cérebro), e em seguida foram pesados e a atividade radioativa foi medida no contador de raios gama.

Para análise de gráficos e estatísticas, foi utilizado o software Prisma (versão 8.0.2, 263, GraphPad Prism Software Inc., Jolla, CA, EUA), pela análise de variância “two way ANOVA”. Os dados foram calculados usando a porcentagem de dose injetada por grama de tecido (%ID/g). A razão entre tecido/sangue foi obtida pela divisão da atividade do tecido (%ID/g) pela atividade do sangue (%ID/g).

4.5.4. Avaliação da passagem do mGH e G118R-mGH pela BHE por SPECT-CT

Foi injetada, via intraperitoneal, solução salina com ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH em camundongos C57BL/6J, com atividade de 37 MBq, e 50 μg de hormônio por camundongo. A eutanásia foi realizada nos tempos de 2, 5 e 10 minutos após a injeção, e foram colocadas apenas as cabeças na câmara de escaneamento. As imagens foram obtidas após 1 hora. A avaliação da passagem ou não do hormônio através da barreira hematoencefálica, bem como a sua localização nas regiões anatômicas do cérebro, foram avaliadas por tomografia computadorizada de emissão de fóton único - tomografia computadorizada (SPECT-CT), analisado no microPET (Albira), em parceria com o Centro de Radiofarmácia do IPEN. Faz parte de uma pesquisa em

andamento sobre a influência dos receptores de GH na passagem desse hormônio através da BHE.

Para análise de gráficos e estatísticas, foi utilizado o software Prisma (versão 8.0.2, 263, GraphPad Prism Software Inc., Jolla, CA, EUA), pela análise de variância “two way ANOVA”.

5. RESULTADOS

5.1. Plasmídeos pcDNA 3.4- TOPO-mGH e 3.4-TOPO-G118R- mGH

5.1.1. Construção dos primers e plasmídeo pcDNA 3.4- TOPO- mGH e 3.4- TOPO- G118R-mGH

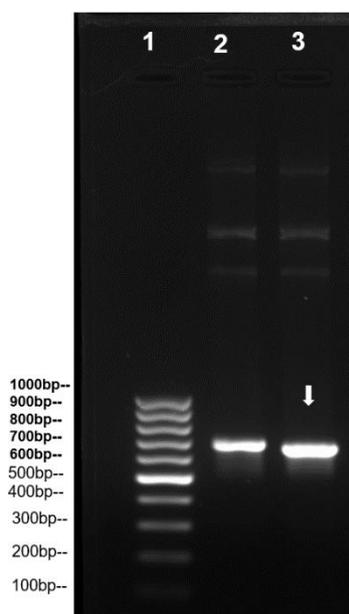
Inicialmente, para realizar a construção dos *primers* foi necessário analisar a proteína (mRNA), da sequência do mGH já conhecida e depositada no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3), e assim obter a sequência codificadora (CDS) incluindo o peptídeo sinal.

Para o desenho dos *primers*, tanto do *sense* quanto do *antisense*, foi utilizado o site Integrated DNA Technologies (IDT), SciTools™ Web Tools, para fazer os testes das sequências, observando o tamanho, a temperatura de anelamento, analisar a possibilidade de formar estruturas secundárias como o *hairpin*. Logo após, foi solicitada a síntese dos mesmos na empresa Exxtend Solução em Oligos (Paulínia, SP).

Com isso, foi obtido o mGH do plasmídeo pcDNA 3.1 por PCR (Figura 19), com a presença do fragmento de 651 pares de base (pb), utilizando os *primers sense* mGH: 5' GCA ATG GCT ACA GAC TCT CGG ACC 3' e *antisense* mGH: 5' CTA GAA GGC ACA GCT GCT TTC CAC 3'.

Figura 19: Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, após eletroforese com amostra do PCR do plasmídeo pcDNA 3.1-mGH. (1) marcador de peso molecular de 100 pb; (2) amostra com PCR pcDNA 3.1-mGH com *primer forward* 5' TGCTTGGCAATGGCTACA 3' e *reverse* 5' CTGGTGAGTGGCTAGAAG 3', resultando em fragmento de 700 pb. (3) amostra

com PCR do pcDNA 3.1-mGH com os *primers forward* 5' GCA ATG GCT ACA GAC TCT CGG ACC 3' e *reverse* 5' CTA GAA GGC ACA GCT GCT TTC CAC 3', resultando em fragmento de 651 pb. A seta branca indica o fragmento utilizado para construção do plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO-mGH.



Fonte: autor da dissertação

Foi extraído o fragmento de 651pb, e realizada a purificação do DNA do gel de agarose (Cellco Biotec®) segundo as instruções do fabricante, resultando em uma concentração de 0,025 µg/µL. Essa amostra foi sequenciada na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), e a sequência obtida foi comparada com a depositada no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3) (Figura 20).

Figura 20: Sequenciamento do mGH realizado na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), e comparação com a sequência já conhecida e estabelecida no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3). Está sendo indicado em amarelo o início do peptídeo sinal ATG e o *stop* códon TAG, e em azul a região que irá sofrer a mutação para o antagonista.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10      20      30      40      50
Sequenciam -----AGRG GGGACGGGTA AGGCKCKMGT MGCCTGCTCT
NM_008117. ATGCTACAG ACTCTCGGAC CTCCTGGCTC CTGACCGT-C AGCCTGCTCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60      70      80      90     100
Sequenciam GCCTGCTCTG GCCTCAGGAG GCTAGTGCTT TTCCCGCCAT GCCCTTGTC
NM_008117. GCCTGCTCTG GCCTCAGGAG GCTAGTGCTT TTCCCGCCAT GCCCTTGTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110     120     130     140     150
Sequenciam AGTCTGTTTT CTAATGCTGT GCTCCGAGCC CAGCACCTGC ACCAGCTGGC
NM_008117. AGTCTGTTTT CTAATGCTGT GCTCCGAGCC CAGCACCTGC ACCAGCTGGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160     170     180     190     200
Sequenciam TGCTGACACC TACAAAGAGT TCGAGCGTGC CTACATTCCC GAGGGACAGC
NM_008117. TGCTGACACC TACAAAGAGT TCGAGCGTGC CTACATTCCC GAGGGACAGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210     220     230     240     250
Sequenciam GCTATTCCAT TCAGAATGCC CAGGCTGCTT TCTGCTTCTC AGAGACCATC
NM_008117. GCTATTCCAT TCAGAATGCC CAGGCTGCTT TCTGCTTCTC AGAGACCATC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260     270     280     290     300
Sequenciam CCGGCCCCCA CAGGCAAGGA GGAGGCCAG CAGAGAACCG ACATGGAATT
NM_008117. CCGGCCCCCA CAGGCAAGGA GGAGGCCAG CAGAGAACCG ACATGGAATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310     320     330     340     350
Sequenciam GCTTCGCTTC TCGCTGCTGC TCATCCAGTC ATGGCTGGGG CCCGTGCAGT
NM_008117. GCTTCGCTTC TCGCTGCTGC TCATCCAGTC ATGGCTGGGG CCCGTGCAGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360     370     380     390     400
Sequenciam TCCTCAGCAG GATTTTCACC AACAGCCTGA TGTTGCGCAC CTCGGACCGT
NM_008117. TCCTCAGCAG GATTTTCACC AACAGCCTGA TGTTGCGCAC CTCGGACCGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410     420     430     440     450
Sequenciam GTCTATGAGA AACTGAAGGA CCTGGAAGAG GGCATCCAGG CTCTGATGCA
NM_008117. GTCTATGAGA AACTGAAGGA CCTGGAAGGA GGCATCCAGG CTCTGATGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460     470     480     490     500
Sequenciam GGAGCTGGAA GATGGCAGCC CCCGTGTTGG GCAGATCCTC AAGCAAACCT
NM_008117. GGAGCTGGAA GATGGCAGCC CCCGTGTTGG GCAGATCCTC AAGCAAACCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510     520     530     540     550
Sequenciam ATGACAAGTT TGACGCCAAC ATGCGCAGCG ACGACGCGCT GTCAAAAAAC
NM_008117. ATGACAAGTT TGACGCCAAC ATGCGCAGCG ACGACGCGCT GTCAAAAAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          560     570     580     590     600
Sequenciam TATGGGCTGC TCTCCTGCTT CAAGAAGGAC CTGCACAAAG CGGAGACCTA
NM_008117. TATGGGCTGC TCTCCTGCTT CAAGAAGGAC CTGCACAAAG CGGAGACCTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          610     620     630     640     650
Sequenciam CCTGCGGGTC ATGAAGTGTC GCCGCTTGT GAAAAGCAGC TGIGCCITCT
NM_008117. CCTGCGGGTC ATGAAGTGTC GCCGCTTGT GAAAAGCAGC TGIGCCITCT

.....|...
Sequenciam AGACAMGC

```

Fonte: autor da dissertação

Com a confirmação da sequência correta, o fragmento purificado foi inserido no pcDNA 3.4-TOPO (Invitrogen®). No caso do G118R-mGH, foi realizada a compra do plasmídeo já com a sequência de mGH modificada, ou seja, com o códon para a glicina “GGC” que foi substituído pelo códon da arginina “CGC”, correspondente ao aminoácido na posição 118 da proteína madura.

5.1.2. Transformação de bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α

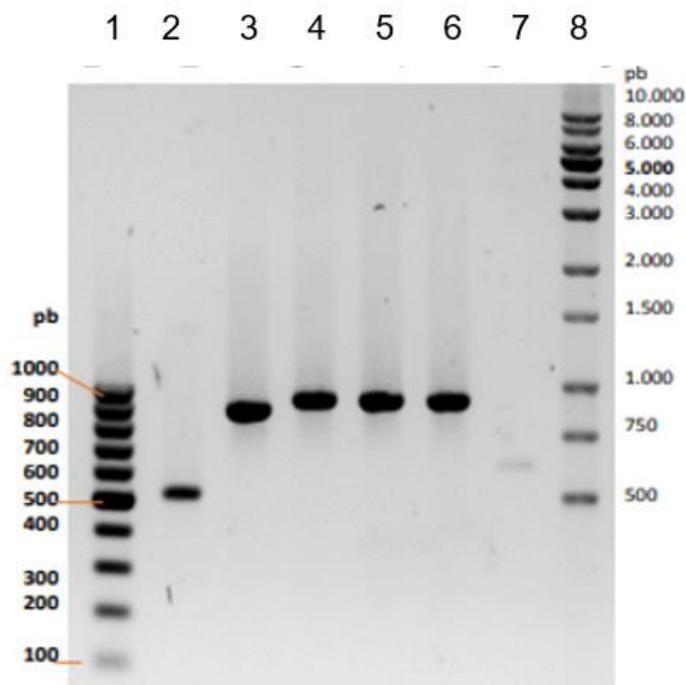
Após o processo de construção do plasmídeo, foi realizada a transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5α, para produção do plasmídeo, com o objetivo de obter uma quantidade da ordem de 300 µg para cada plasmídeo, suficiente para 10 transfecções.

Após a incubação em meio LB com ampicilina, fizemos testes de PCR para confirmação da presença do pcDNA 3.4-TOPO-mGH (Figura 21 e 22).

Na figura 21 é possível observar o fragmento com 908 pb obtido por PCR com os *primers* do kit do pcDNA 3.4-TOPO, como esperado. Porém não era possível afirmar se estava na orientação correta.

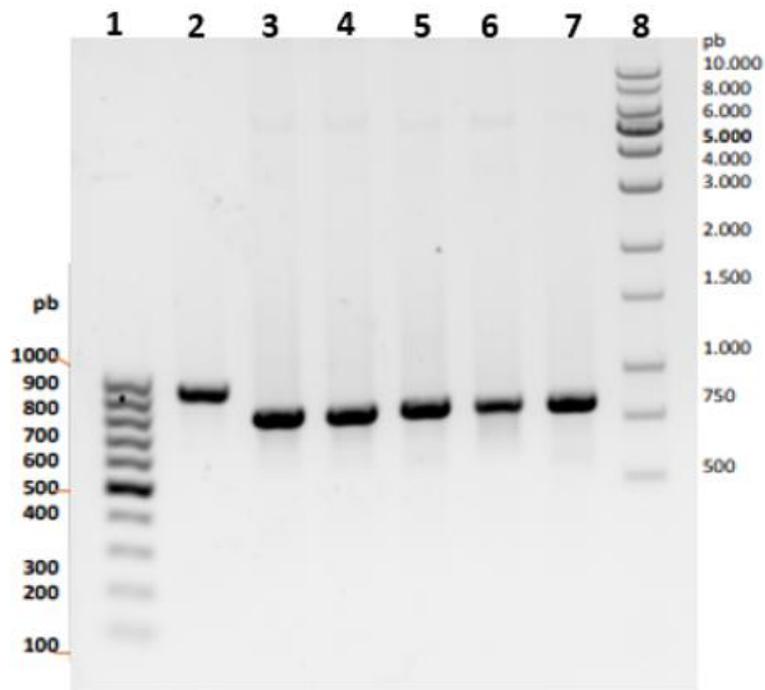
Na figura 22 observamos o resultado do PCR utilizando o *primer forward* do kit do pcDNA 3.4-TOPO e o *primer reverse* do mGH. Na orientação correta é esperado obter um fragmento de 808 pb, como de fato ocorreu.

Figura 21: Foto da eletroforese do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, com amostras após PCR realizado com o kit do pcDNA 3.4-TOPO para confirmação da presença do mGH. (1) marcador de massa molecular de 100 pb; (2) controle positivo do kit com fragmento de 500 pb; (3) amostra do PCR com pcDNA 3.4 G118R-mGH, controle positivo, com 908 pb; (4), (5) e (6) PCR de três colônias 908 pb; (7) amostra com PCR do pcDNA 3.1-mGH, como controle negativo; (8) marcador de massa molecular de 10.000 pb.



Fonte: autor da dissertação

Figura 22: Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, com amostras do PCR realizado com o *primer forward* do kit do pcDNA 3.4-TOPO e o *primer reverse* do mGH, para confirmar a orientação correta do mGH. (1) marcador de massa molecular de 100 pb; (2) PCR de uma colônia com os *primers* do kit do pcDNA 3.4 TOPO, 908 pb; (3) e (4) duas colônias do G118R-mGH, controle positivo, 808 pb; (5), (6) e (7) três colônias pcDNA 3.4 TOPO-mGH, 808 pb; (8) marcador de massa molecular de 10.000 pb.



Fonte: autor da dissertação

Além da confirmação pelo tamanho do fragmento obtido por PCR, os plasmídeos das colônias pcDNA 3.4 TOPO-mGH e pcDNA 3.4 TOPO-G118R-mGH foram sequenciados na Unifesp com o primer *reverse* do kit pcDNA 3.4 TOPO: 5' CAA CAT AGT TAA GAA TAC CAG TC 3' (Figura 23A e B, respectivamente).

Figura 23: Sequenciamento realizado na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), em comparação com a sequência já conhecida e estabelecida no NCBI, *Mus musculus* Growth Hormone mRNA (GenBank Accession number: NM_008117.3). **(A)** mGH, sublinhado em azul o códon para Glicina “GGC” na posição 118 da proteína madura; **(B)** G118R-mGH, sublinhado em verde o códon da Arginina “CGC” na posição 118 indicando a mutação. O início e final do cDNA estão em amarelo.

A

```
.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE ACCGCCMAYT CMASSGCTGT TTTTGACCMT CCCATAAGAG ACCACCCGGA
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CCGATTCCAG CCTCCGGACT CTAGAACAAT GGCTACAGAC TCTCGGGACC
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE TTCCCTGGCT CCTGACCGTC AGCCTGCTCT GCCTGCTCTG GCCTCAGGAG
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE GCTAGTGTIT TTCCCRCCAT GCCCTGTGCC AGTCTGTTTT CTAATGCTGT
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE GCTCCGAGCC CCAGCACCTG CACCAGCTGG CTGCTGACAC CTACAAAGAG
mGH - NM_0 -----GACAC CTACAAAGAG

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE TTCGAGCGTG CCTACATTCC CGAGGGACAG CGCTATTCCA TTCAGAATGC
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CCAGGCTGCT TTCTGCTTCT CAGAGACCAT CCCGGCCCCC ACAGGCAAGG
mGH - NM_0 -----CCAGGCTGCT TTCTGCTTCT CAGAGACCAT CCCGGCCCCC ACAGGCAAGG

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE AGGAGGCCCA GCAGAGAACC GACATGGAAT TGCTTCGCTT CTCGCTGCTG
mGH - NM_0 -----

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CTCATCCAGT CATGGCTGGG GCCCGTGCAG TTCCTCAGCA GGATTTTCAC
mGH - NM_0 -----CTCATCCAGT CATGGCTGGG GCCCGTGCAG TTCCTCAGCA GGATTTTCAC

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CAACAGCCTG ATGTTCCGCA CCTCGGACCG TGTCTATGAG AAAGTGAAGG
mGH - NM_0 -----CAACAGCCTG ATGTTCCGCA CCTCGGACCG TGTCTATGAG AAAGTGAAGG

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE ACCTGAAGA GGCATCCAG GCTCTGATGC AGGAGCTGGA AGATGGCAGC
mGH - NM_0 -----GGCATCCAG GCTCTGATGC AGGAGCTGGA AGATGGCAGC

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CCCCCTGTTG GGCAGATCCT CAAGCAAACC TATGACAAGT TTGACGCCAA
mGH - NM_0 -----CCCCCTGTTG GGCAGATCCT CAAGCAAACC TATGACAAGT TTGACGCCAA

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CATGCGCAGC GACGACGCGC TGCTCAAAAA CTATGGGCTG CTCTCCTGCT
mGH - NM_0 -----CATGCGCAGC GACGACGCGC TGCTCAAAAA CTATGGGCTG CTCTCCTGCT

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE TCAAGAAGGA CCTGCACAAA GCGGAGACCT ACCTGCGGGT CATGAAGTGT
mGH - NM_0 -----TCAAGAAGGA CCTGCACAAA GCGGAGACCT ACCTGCGGGT CATGAAGTGT

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CGCCGCTTTG TGGAAAGCAG CTGTGCCITC TAGGATATCT CGACAATCAA
mGH - NM_0 -----CGCCGCTTTG TGGAAAGCAG CTGTGCCITC TAGGATATCT CGACAATCAA

.....| .....| .....| .....| .....|
1_PRI1_IPE CCTCTGGATT ACAAAGTTK RAA
mGH - NM_0 -----CCTCTGGATT ACAAAGTTK RAA
```

Fonte: autor da dissertação

B

```
.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
4 PRI1_IPE ACCGCCMAYT CMASSGTGT TTTTGACCMT CCCATAAGAG ACCACCGGGA
mGH - NM_0 -----

.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
4 PRI1_IPE CCGATTCCAG CCTCCGGACT CTAGAACAAT GGCTACAGAC TCTCGGGACC
mGH - NM_0 -----

.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
4 PRI1_IPE TTCCCTGGCT CCTGACCGTC AGCCTGCTCT GCCTGCTCTG GCCTCAGGAG
mGH - NM_0 -----

.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
4 PRI1_IPE GCTAGTGCTT TTCCRCOCAT GCCCTTGTC AGTCTGTTTT CTAATGCTGT
mGH - NM_0 -----

.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
4 PRI1_IPE GCTCCGAGCC CCAGCACCTG CACCAGCTGG CTGCTGACAC CTACAAAGAG
mGH - NM_0 -----
                        GACAC CTACAAAGAG

.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
4 PRI1_IPE TTGAGGGGTG CCTACATTCC CGAGGGACAG CGCTATTCCA TTCAGAAATGC
mGH - NM_0 -----

.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
4 PRI1_IPE CCAGGCTGCT TTCTGCTTCT CAGAGACCAT CCCGGCCCCC ACAGGCAAGG
mGH - NM_0 -----
                        CCAGGCTGCT CAGAGACCAT CCCGGCCCCC ACAGGCAAGG

.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
4 PRI1_IPE AGGAGGCCCA GCAGAGAACC GACATGGAAT TGCTTCGCTT CTCGCTGCTG
mGH - NM_0 -----
                        AGGAGGCCCA GCAGAGAACC GACATGGAAT TGCTTCGCTT CTCGCTGCTG

.....|.....|.....|.....|.....|
     410     420     430     440     450
4 PRI1_IPE CTCATCCAGT CATGGCTGGG GCCCGTGCAG TTCTCAGCA GGATTTTCAC
mGH - NM_0 -----
                        CTCATCCAGT CATGGCTGGG GCCCGTGCAG TTCTCAGCA GGATTTTCAC

.....|.....|.....|.....|.....|
     460     470     480     490     500
4 PRI1_IPE CAACAGCCTG ATGTTCCGCA CCTCGGACCG TGCTATGAG AACTGAAGG
mGH - NM_0 -----
                        CAACAGCCTG ATGTTCCGCA CCTCGGACCG TGCTATGAG AACTGAAGG

.....|.....|.....|.....|.....|
     510     520     530     540     550
4 PRI1_IPE ACCTGGAAGA GGCATCCAG GCTCTGATGC AGGAGCTGGA AGATGGCAGC
mGH - NM_0 -----
                        ACCTGGAAGA GGCATCCAG GCTCTGATGC AGGAGCTGGA AGATGGCAGC

.....|.....|.....|.....|.....|
     560     570     580     590     600
4 PRI1_IPE CCCCCTGTTG GGCAGATCCT CAAGCAAACC TATGACAAGT TTGACGCCAA
mGH - NM_0 -----
                        CCCCCTGTTG GGCAGATCCT CAAGCAAACC TATGACAAGT TTGACGCCAA

.....|.....|.....|.....|.....|
     610     620     630     640     650
4 PRI1_IPE CATGCCGAGC GACGACGCGC TGCTCAAAA CTATGGGCTG CTTCTCTGCT
mGH - NM_0 -----
                        CATGCCGAGC GACGACGCGC TGCTCAAAA CTATGGGCTG CTTCTCTGCT

.....|.....|.....|.....|.....|
     660     670     680     690     700
4 PRI1_IPE TCAAGAAGGA CCTGCACAAA GCGGAGACCT ACCTGCGGGT CATGAAGTGT
mGH - NM_0 -----
                        TCAAGAAGGA CCTGCACAAA GCGGAGACCT ACCTGCGGGT CATGAAGTGT

.....|.....|.....|.....|.....|
     710     720     730     740     750
4 PRI1_IPE CGCCGCTTTG TGGAAAGCAG CTGTGCCTTC TAGGATATCT CGACAATCAA
mGH - NM_0 -----
                        CGCCGCTTTG TGGAAAGCAG CTGTGCCTTC TAGGATATCT CGACAATCAA

.....|.....|.....|.....|.....|
     760     770
4 PRI1_IPE CCTCTGGATT ACAAAAGTTR RAA
mGH - NM_0 -----
```

Fonte: autor da dissertação

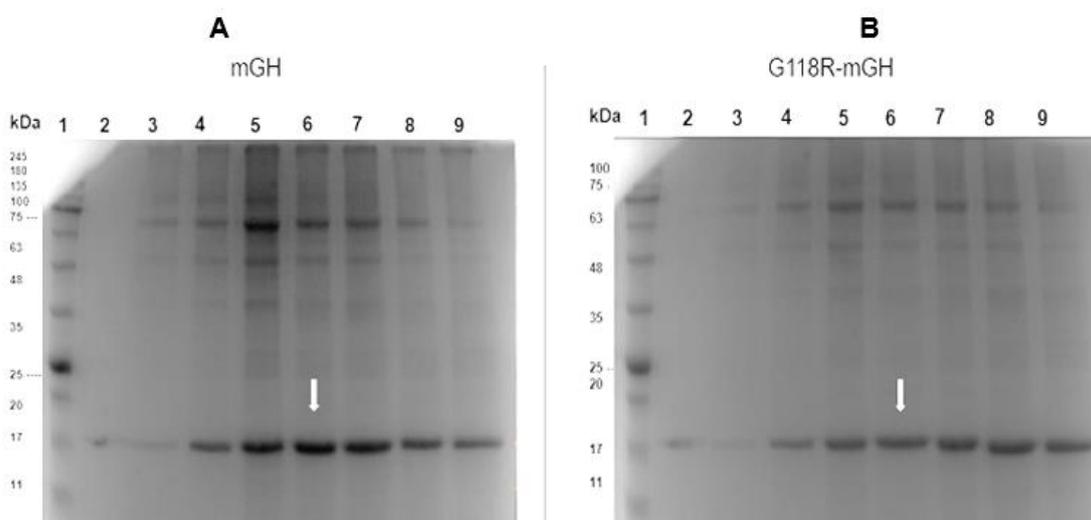
Com a confirmação do plasmídeo pcDNA 3.4 TOPO-mGH, foram realizadas três midipreps, que foram, no final do processo, ressuspensas em 100 µL de volume de água ultrapura. A concentração de G118R-mGH foi de

754,1 ng/ μ L e de mGH foi de 3623,8 ng/ μ L, com razão A260/280 de 1,89 e 1,90, respectivamente. Como são utilizados 30 μ g de plasmídeo por transfecção por frasco de 30 mL de meio de cultura contendo as células HEK293F, na concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL, as quantidades obtidas de plasmídeos foram suficientes para transfectar 2,5 frascos para G118R-mGH e 12 frascos para mGH. No caso do G118R-mGH foi necessária realizar essa etapa três vezes.

5.2. Produção de mGH e G118R-mGH em células HEK293F

Após a transfecção transiente, usando 30 μ g do plasmídeo e 30 mL de suspensão de HEK293F, foram coletados 1 mL de meio condicionado da transfecção, diariamente, do dia 1 ao dia 7, todos os dias. Para determinar o melhor dia de produção dos hormônios, realizamos a eletroforese em gel de poli-acrilamida 15% (SDS-PAGE). A figura 24A representa a produção de mGH, e a figura 24B a produção do G118R-mGH. A massa molecular dessa proteína é de 21,8 kDa, e utilizamos como padrão o hormônio de crescimento humano (hGH), com peso molecular de 22 kDa.

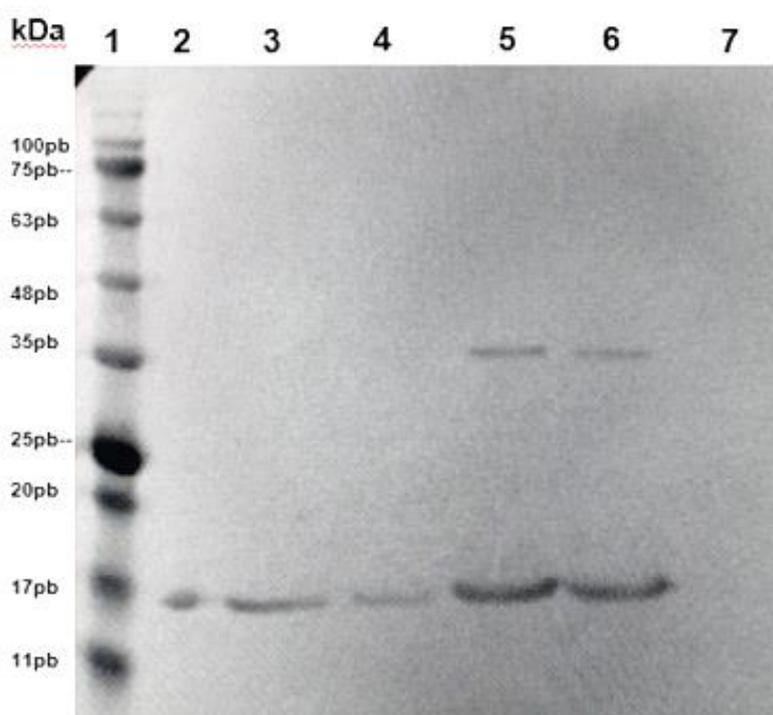
Figura 24: Foto da análise por eletroforese em gel de poli-acrilamida 15%, não reduzido, referente à produção em células HEK293F. **(A)** produção do mGH: (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 μ g; (3) a (9) amostras de mGH dos dias 1 a 7. A seta branca indica o quarto dia de produção. **(B)** (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 μ g; (3) a (9) amostras de G118R-mGH dos dias 1 a 7. A seta branca indica o quarto dia de produção.



Fonte: autor da dissertação

No Western Blotting da Figura 25, é possível confirmar que no quarto dia foi obtida a produção máxima.

Figura 25: Western Blotting das amostras do meio condicionado HEK293F. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 100 ng, (3) e (4), amostras dos dias 4 e 5 da produção do mGH; (5) e (6) amostras dos dias 4 e 5 da produção do G118R-mGH; (7), controle negativo de transfecção.



Fonte: autor da dissertação

Após a definição do melhor dia de produção, foram realizadas três produções de 30 mL para o mGH e seis produções de 30 mL para o G118R-mGH, visando obter material para a purificação, caracterização e análises físico-químicas.

5.3. Purificação e caracterização do mGH e G118R-mGH

Antes da purificação foi realizada uma diálise das amostras, com o tampão Tris – HCl 0,05M pH 8,5 (tampão A), para fazer uma limpeza inicial do

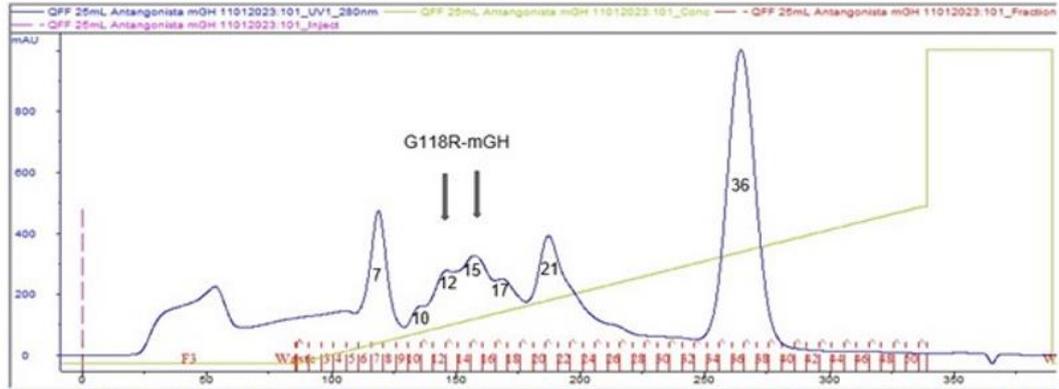
meio coletado. Foram realizadas 3 trocas desse mesmo tampão, com duração total de 16 horas.

5.3.1. Purificação utilizando técnica cromatográfica de troca iônica do mGH e G118R-mGH

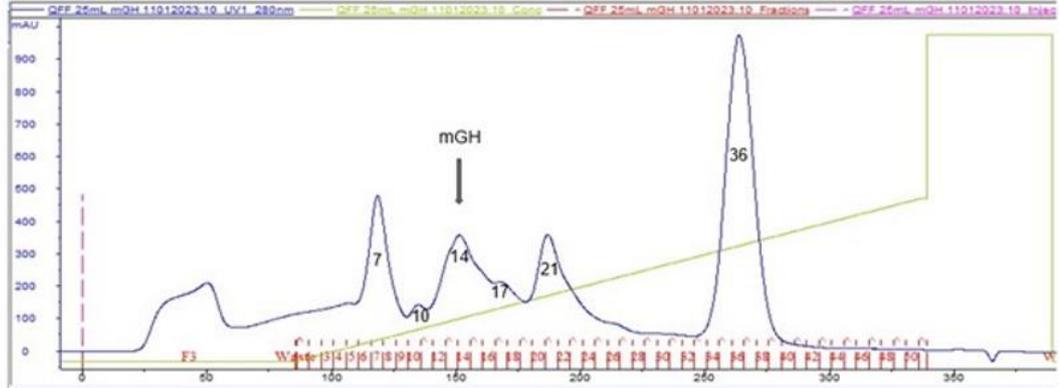
Na coluna com resina Q-Sepharose Fast Flow (Figura 26A e B), empacotada em coluna de vidro e acoplada ao sistema “AKTA Purifier” (General Electric), foi utilizado o tampão Tris –HCl 0,05 M pH 8,5 (tampão A) e tampão Tris–HCl 0,05 M pH 8,5 + 2 M NaCl (tampão B) para realizar o gradiente, em 25 mL de volume de coluna. Foram coletadas frações de 5 mL, indicadas em vermelho. Figura 26A representa a purificação do G118R-mGH, e a figura 26B representa a purificação do mGH.

Figura 26: Cromatograma da purificação com a coluna contendo a resina Q-Sepharose Fast Flow (QFF), em unidade de absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Frações coletadas, 5mL em cada, indicadas em vermelho. Em verde é representado o gradiente de NaCl. **(A)** G118R-mGH, fração #12 corresponde a 238 mM de NaCl (11,9% de tampão B), e fração #15 corresponde a 284 mM de NaCl (14,2% de tampão B); **(B)** mGH, fração #14 corresponde a 264 mM de NaCl (13,2% de tampão B).

A



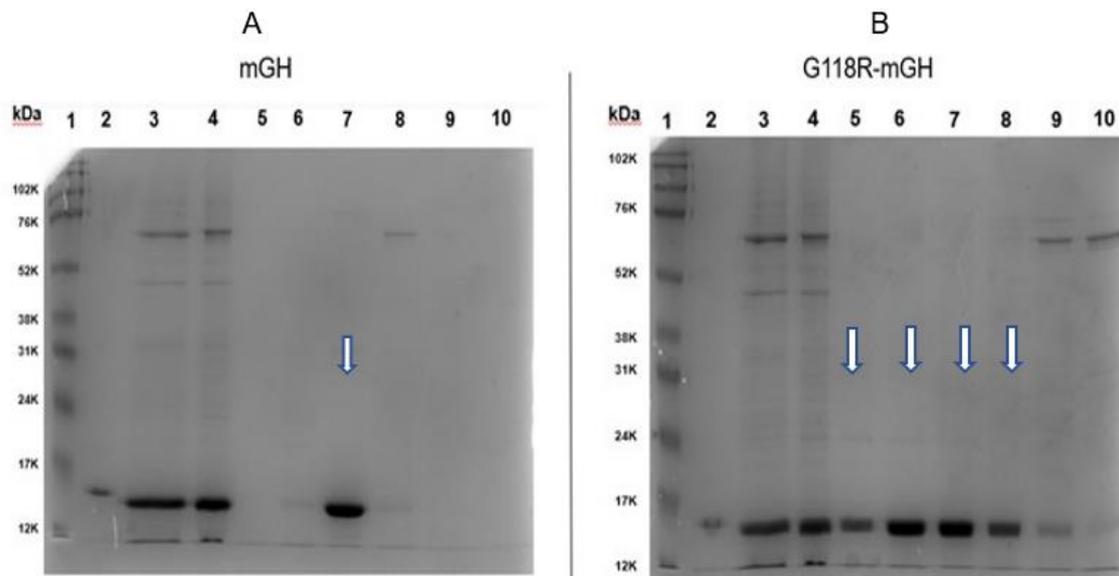
B



Fonte: autor da dissertação

É possível observar uma diferença entre os picos 12 e 15 (frações 11 a 16) comparando os cromatogramas do mGH e do GHA. Foram analisadas por SDS-PAGE as frações 7, 10, 14, 17, 21 e 36 de mGH (Figura 27A), e as frações 11, 12, 13, 14, 15 e 16, para a purificação do G118R-mGH (Figura 27B).

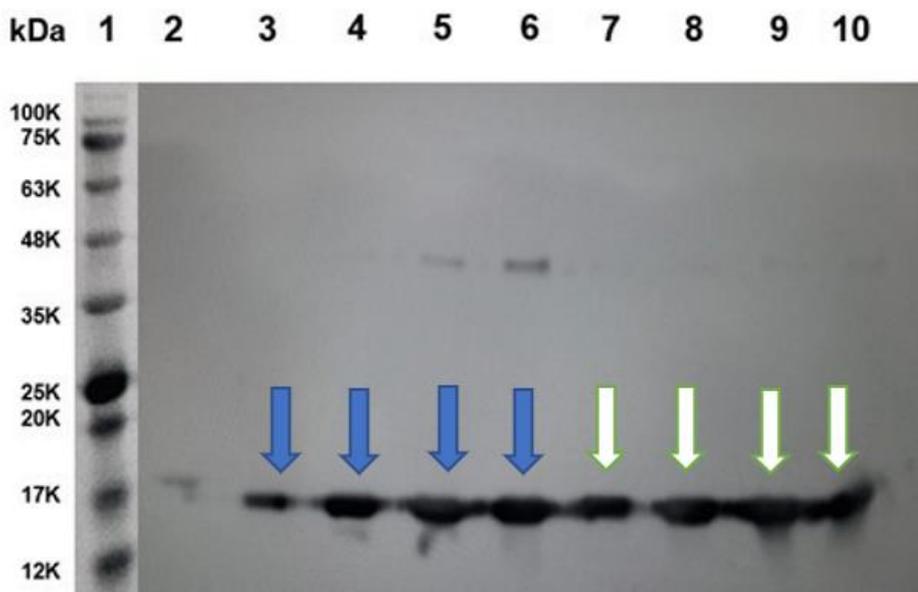
Figura 27: SDS-PAGE 15%, não reduzido, das amostras coletadas da QFF. **A:** mGH, (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3) meio condicionado pool antes da diálise; (4) meio condicionado pool depois da diálise, (5-10) frações 7,10,14,17,21 e 36, A fração 14 está indicada pela seta branca. **B:** (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3) pool do meio condicionado antes da diálise; (4) pool do meio condicionado depois da diálise, (5-8) frações 11, 12, 13 e 14, indicadas pelas setas brancas; (9-10) frações 15 e 16.



Fonte: autor da dissertação

No caso do mGH, a proteína se concentra na fração 14. Já no caso do G118R-mGH, observamos que temos bastante produto da proteína nas frações 11, 12, 13 e 14, sendo que no caso das frações 15 e 16, com menos material e outras formas de massa maior, mostrando menos pureza nessa região. Então, para confirmação, foi realizado Western Blotting (Figura 28), com as frações 11, 12, 13 e 14 tanto do mGH quanto do G118R-mGH, no qual conseguimos verificar a presença de ambas as proteínas.

Figura 28: Western blotting de amostras coletadas da QFF, não reduzido. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 µg, (3-6) mGH frações 11, 12, 13 e 14, setas azuis, (7-10) G118R-mGH frações 11, 12, 13 e 14, setas brancas.



Fonte: autor da dissertação

5.3.2. Análise por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC) do mGH e G118R-mGH

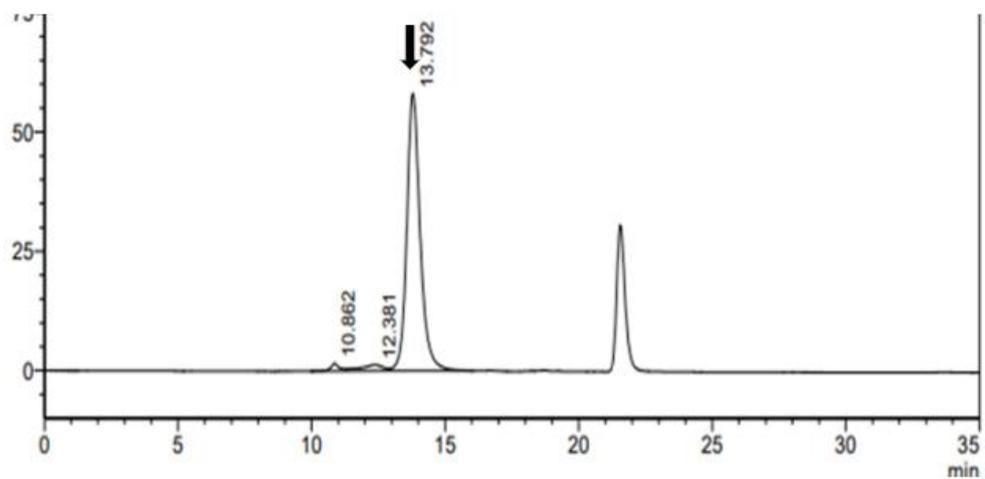
Com a confirmação da presença de mGH e GHA, nas respectivas frações, o próximo passo foi realizar uma análise por HPSEC, tanto do mGH (Figura 29C) quanto do G118R-mGH (Figura 29D) para quantificação e determinação da pureza do material.

Foi feito um pool das frações 11 a 14, totalizando 20 mL, de cada proteína e foi aplicado 100 μ L na coluna TosoHaas TSK 2000, com tampão bicarbonato de amônio 0,025M, pH 7,0, temperatura ambiente.

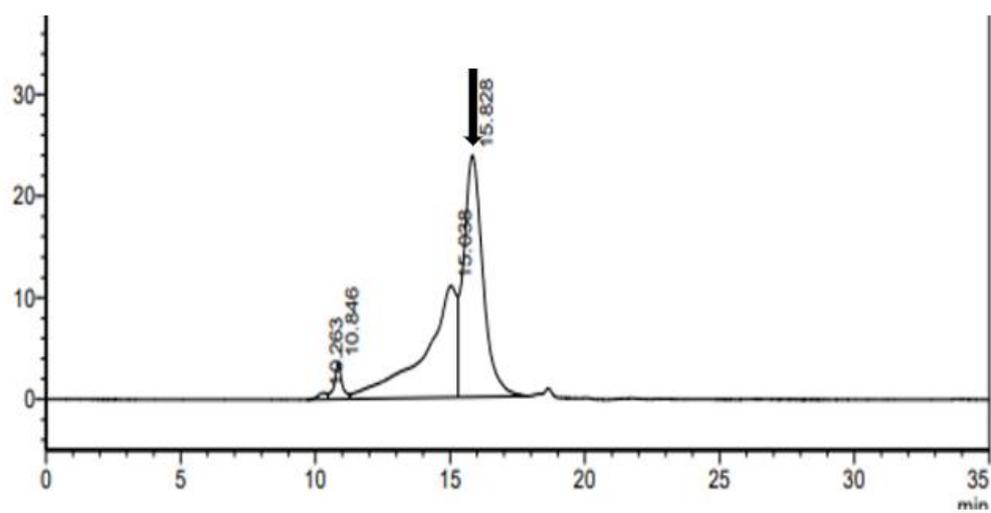
Foram utilizados dois controles (Figura 29A e B), o rec-hGH (controle interno) e o pit-mGH (NIH).

Figura 29: Cromatogramas do HPSEC. A: rec-hGH (controle interno), 5 μ g/ 5 μ L, com pico de T_R 13,7 min; B: pit- mGH (NIH), 5 μ g/ 50 μ L, seta com T_R 15,8 min, (C) mGH QFF pool #11-14 – seta indica pico com T_R 15,63 min, (D) G118R-mGH QFF pool #11-14 – setas indicam picos com T_R 15,8 min e 16,8 min.

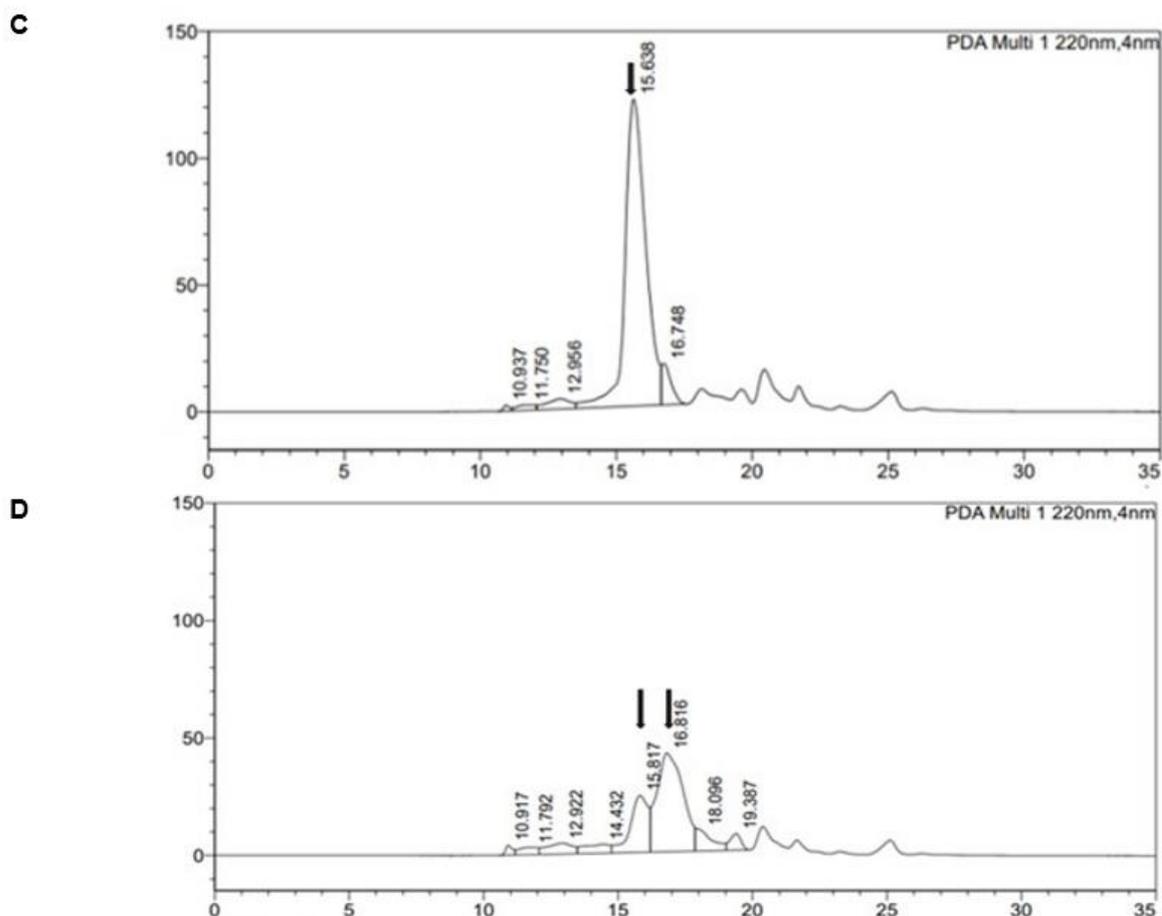
A



B



Fonte: autor da dissertação

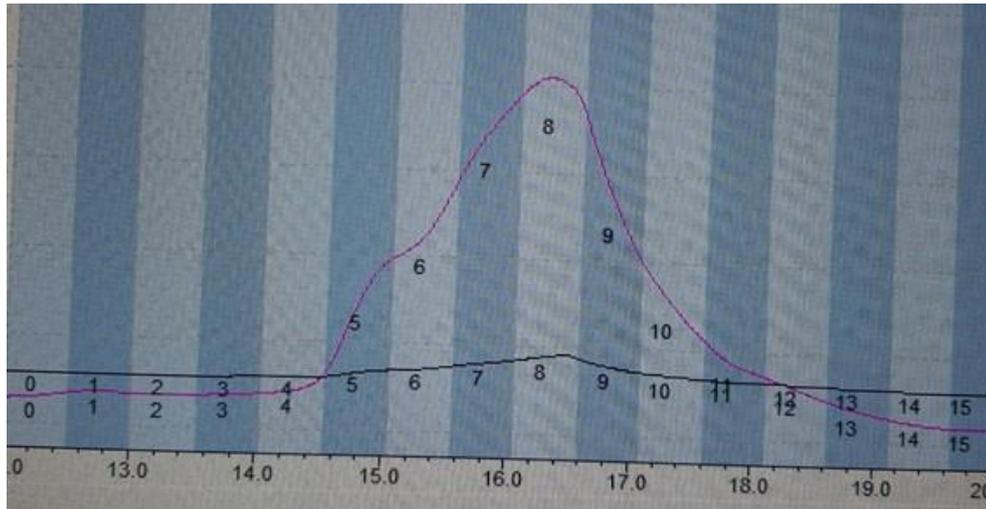


Fonte: autor da dissertação

A quantificação calculada com base na área sob o gráfico em comparação ao controle rec-hGH resultou em 2,99 mg de mGH em 20 mL de Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 + 2 M NaCl e pureza de 89%. Para o G118R-mGH 1,84 mg em 20 mL de Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 + 2 M NaCl e pureza de 74%.

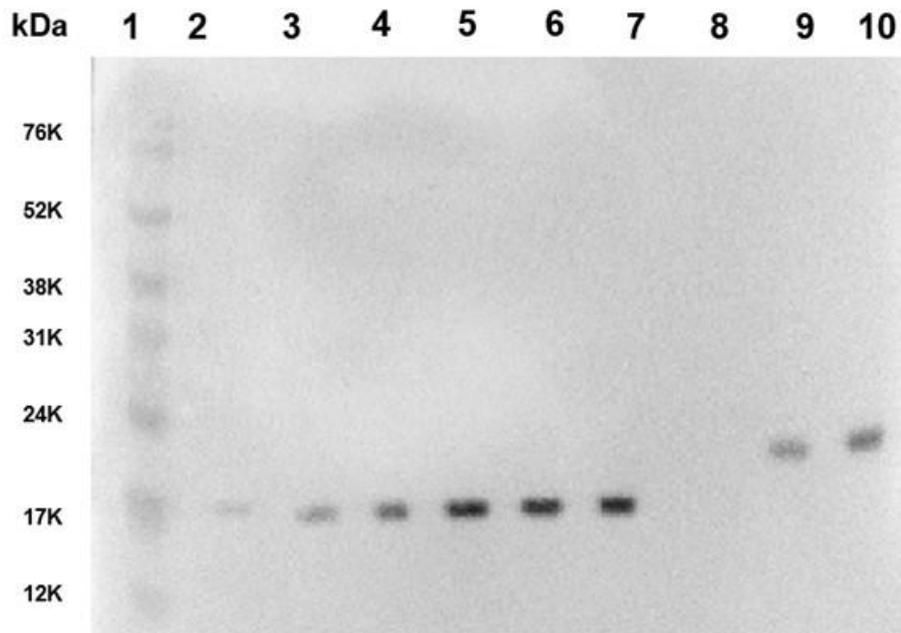
Porém, no caso do G118R-mGH há dois picos. Então, foi analisado o pool do G118R-mGH no HPSEC novamente com coleta das frações 5, 6, 7, 8 e 9. (Figura 30). O Western Blotting (Figura 31) mostrou que ambos os picos eram realmente do antagonista.

Figura 30: Ampliação do cromatograma do HPSEC com coleta do G118R-mGH, entre 12 e 20 min, para análise por WB.



Fonte: autor da dissertação

Figura 31: Western blotting das frações coletadas na HPSEC que contém G118R-mGH. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 μ g, (3 – 7) amostras não-reduzidas das frações 5-9. (9-10) amostras reduzidas das frações 6 e 8.



Fonte: autor da dissertação

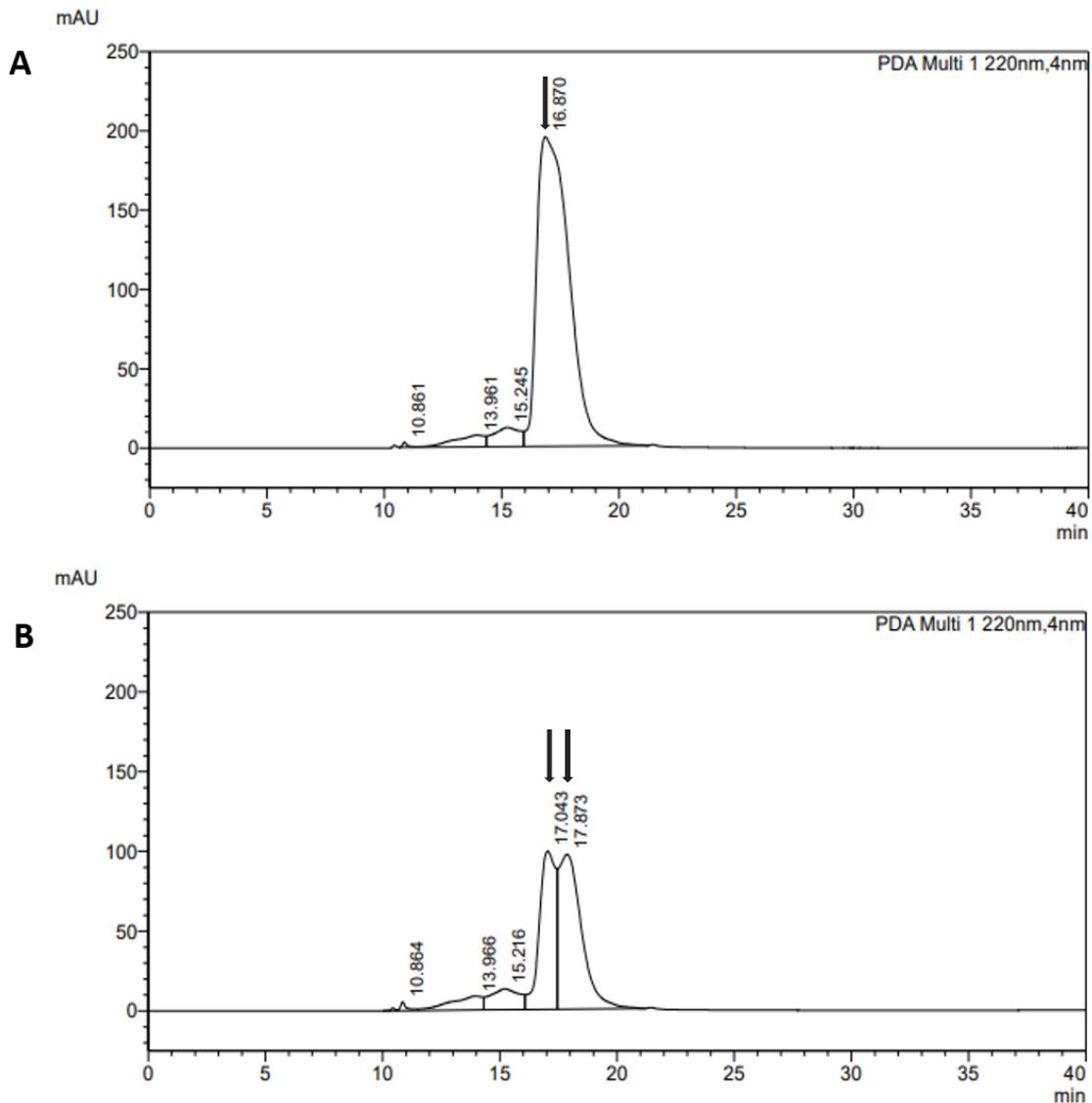
Nesse caso, se houvesse isoformas de massa clivadas, as amostras com DTT (SDS-PAGE reduzido), das frações 6 e 8 reduzidas apresentariam

mais de uma banda. Amostras de GH reduzidas apresentam quebra das pontes dissulfeto e caso tenha ocorrido alguma clivagem na cadeia da proteína os fragmentos são separados, mas foi possível observar claramente que só há uma banda de cada, logo a clivagem não ocorreu. Além disso, conseguimos confirmar que ambos os picos são G118R-mGH, sendo a fração 6 o ponto mais alto do primeiro pico, e a 8 o ponto mais alto do segundo pico.

Foi realizada a troca de tampão, através de centrifugação, em colunas de filtração com poros de 3 kDa (Amicon), de solução Tris-HCl com NaCl para solução salina (NaCl 0,9%).

E novamente foi analisada por HPSEC (Figura 32 A e B), para saber se houve perda de material nesse processo. Como controle foi utilizado o pit-mGH (NIH).

Figura 32: Cromatogramas obtidos por HPSEC do pool da purificação de mGH e G118R-mGH após diálise em NaCl 9%. **(A)** mGH, com T_R 16,87 min e **(B)** G118R-mGH, T_R 17 min e 17,87 min.



Fonte: autor da dissertação

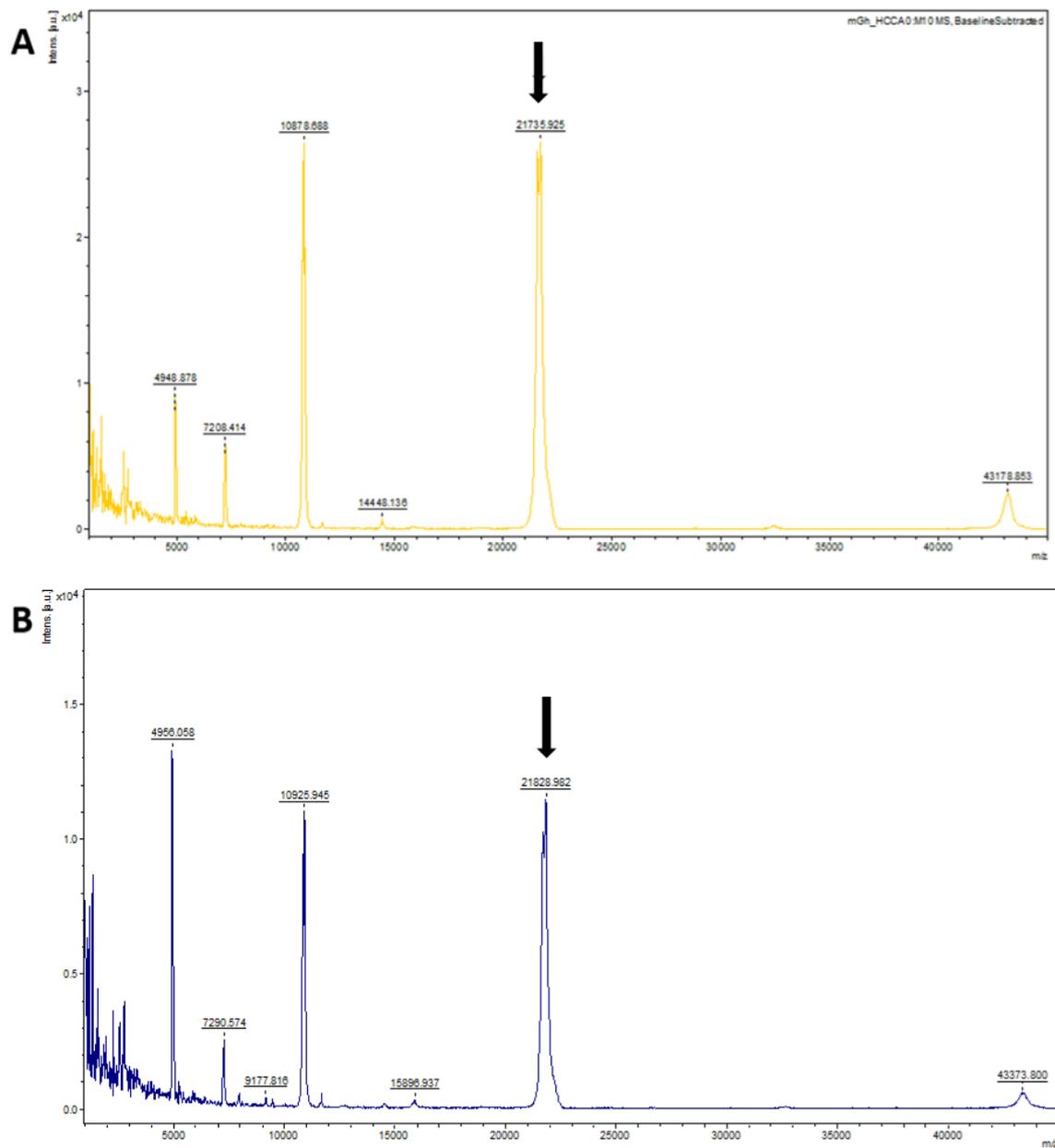
Foram obtidos, no final do processo de purificação, 4,97 mg de mGH em 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) com pureza de 91,8% e 3,02 mg de G118R-mGH em 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) com pureza de 84,6%.

5.3.3. Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) do mGH e G118R-mGH

Para finalizar o a etapa de caracterização do mGH e de seu antagonista G118R-mGH, as amostras foram dessalinizadas em colunas de filtração com poros de 0,5 Å (Amicon) e analisadas por espectrometria de massa (MALDI-

TOF) (Figura 33). As análises das amostras foram realizadas no CEFAP, no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 33: Espectrometria de massa após a dessalinização das amostras. **(A)** mGH e **(B)** G118R-mGH, ambos indicados pela seta preta.



Fonte: autor da dissertação

Os resultados obtidos mostraram, no caso do mGH (Figura 33A), que a massa molecular apontada foi 21735,925 Da. Para o G118R-mGH (Figura

33B), está sendo apontada a massa molecular de 21828,982 Da, sendo que com a troca do aminoácido glicina (75,07 Da) para arginina (174,2 Da) a massa molecular fica um pouco maior quando comparado com o mGH, e é o que conseguimos observar no gráfico, 93,1 Da contra o valor teórico de 99,1 Da.

Com isso foi finalizada a síntese, caracterização e purificação do mGH e de seu antagonista G118R-mGH, possibilitando os testes em animais.

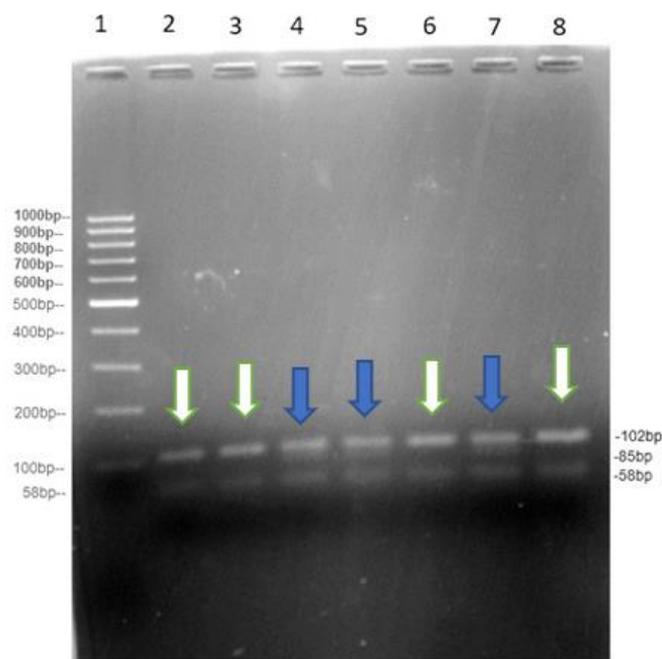
5.4. Bioensaio para avaliar a atividade do mGH e G118R-mGH

5.4.1. Genotipagem

Para o bioensaio, foi preciso realizar genotipagem dos camundongos *lit/lit* para identificar a mutação e diferenciar os animais anões (homozigotos) e os animais heterozigotos. Os cruzamentos são realizados com machos anões e fêmeas heterozigotas. Este esquema se mostrou o mais adequado para obter um maior número de filhotes com a mutação (50% anões e 50% heterozigotos).

Nesse método, podemos identificar os camundongos através da massa molecular das bandas obtidas por PCR, após digestão enzimática, como podemos observar na Figura 34. Quando o animal é anão, identificamos duas bandas, uma com 102 pb e a segunda com 58 pb. Quando o animal é heterozigoto, identificamos três bandas, uma com 102 pb, outra com 85 pb e a terceira com 58 pb. Podemos identificar os camundongos anões através das amostras: 1, 2, 5 e 7, pois apresentam apenas duas bandas (setas brancas). E os camundongos heterozigotos nas amostras com 3 bandas: 3, 4 e 6 (setas azuis).

Figura 34: Genotipagem por PCR seguido de digestão para identificação de camundongos anões. Foto do gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, após eletroforese com amostras de PCR. (1) marcador de massa molecular. (2-8) PCR dos camundongos. Setas brancas camundongos anões, setas azuis heterozigotos.



Fonte: autor da dissertação

A partir dessas identificações, foi possível formar casais e ampliar a colônia de forma mais rápida e confiável, e assim, acelerar a obtenção do número suficiente de animais para a realização do bioensaio.

5.4.2. Bioensaio

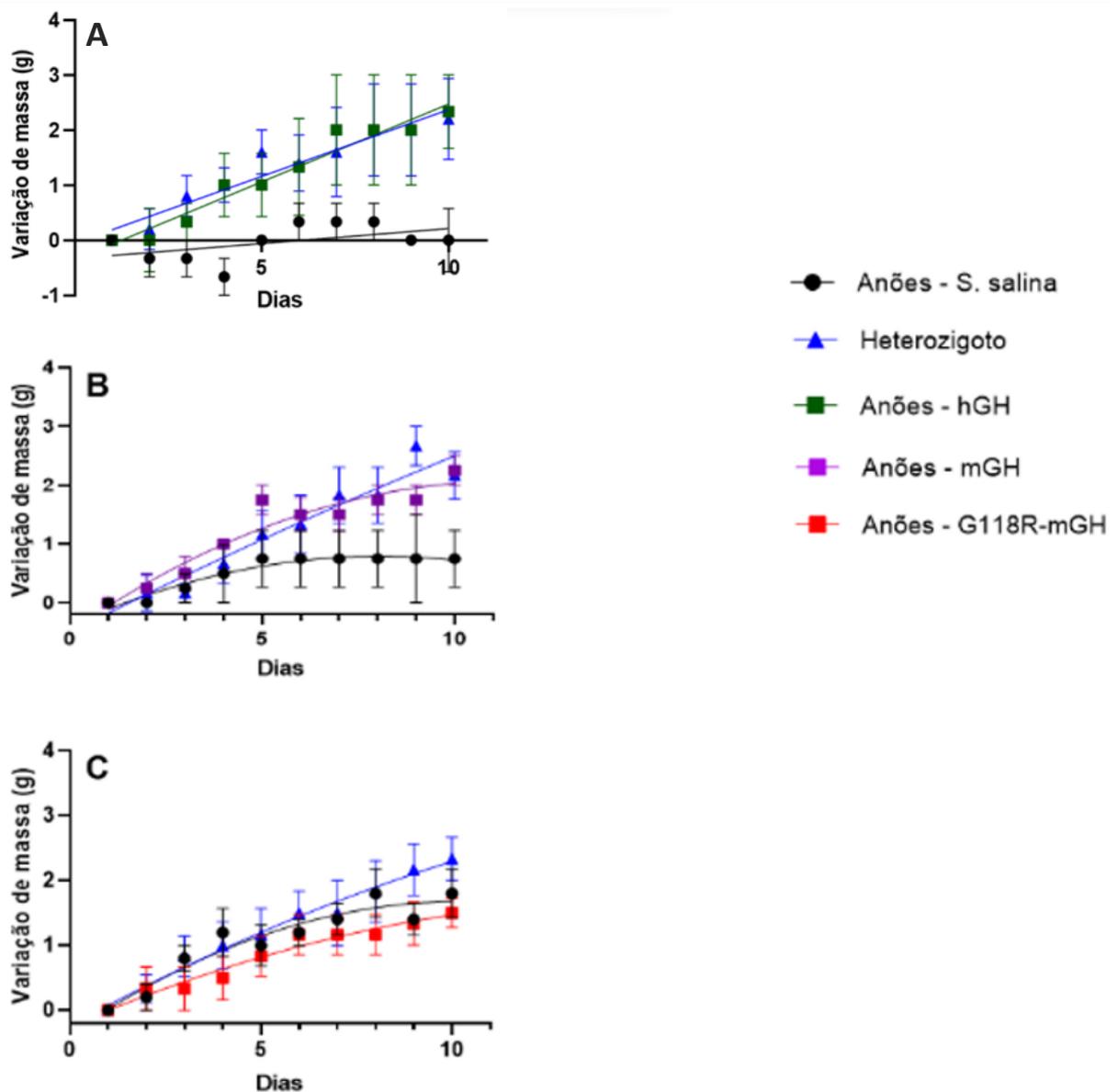
Foi realizado o bioensaio para analisar a atividade biológica tanto do mGH quanto G118R-mGH em camundongos com deficiência de crescimento, anões lit/lit (Figura 35).

Após a ampliação da colônia, camundongos com 22-30 dias de vida foram separados em cinco grupos: (1) controle lit/lit salina, (2) controle positivo hGH, (3) lit/lit mGH, (4) lit/lit G118R-mGH e (5) controle de peso heterozigoto.

Como descrito em Materiais e Métodos, o grupo controle salina (lit/lit) recebeu 0,1 mL de solução salina estéril, todos os dias, durante o tratamento. Os grupos controle positivo hGH (Tabela 2), lit/lit mGH (Tabela 2) e lit/lit G118R-mGH (Tabela 2), separadamente, receberam uma dose de 10 µg de proteína em solução salina estéril, no total de 0,1 mL, todos os dias, durante o

tratamento. Do grupo de controle de peso heterozigoto, os animais foram apenas pesados durante o período de tratamento dos outros grupos. Todos os animais foram eutanasiados após duas horas da injeção do último dia.

Figura 35: Análise dos resultados do bioensaio realizado nos camundongo anões lit/lit. **(A)** Controle positivo hGH, variação de massa durante dez dias, em verde. **(B)** Grupo lit/lit mGH, variação de massa durante dez dias, em roxo. **(C)** Grupo lit/lit G118R-mGH, variação de massa durante dez dias, em vermelho. O grupo controle lit/lit salina está em preto, e o grupo controle de peso heterozigoto está em azul.



Fonte: autor da dissertação

Tabela 2: Resultados das análises do gráfico do grupo controle positivo hGH, grupo mGH e grupo G118R-mGH. Está sendo indicado o número de animais de cada grupo, a significância (P) e a razão (R²).

Grupo controle - hGH			
	Controle negativo	Controle positivo hGH	Heterozigoto
N (=)	3	3	5
Significativo (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
R ²	0,2482	0,9518	0,9295
Grupo mGH			
	Controle negativo	mGH	Heterozigoto
N (=)	4	4	6
Significativo (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
R ²	0,9403	0,9181	0,9375
Grupo G118R-mGH			
	Controle negativo	G118R-mGH	Heterozigoto
N (=)	5	6	9
Significativo (P)	0,0137	0,0137	0,0137
R ²	0,9118	0,9620	0,9833

Fonte: autor da dissertação

Os resultados obtidos mostram a variação da massa dos camundongos referente a cada proteína administrada. Podemos observar que nos grupos tratados com hGH (Figura 35A, Tabela 2) e mGH (Figura 35B, Tabela 2) os animais ganharam peso, obtendo uma diferença estatística significativa com relação ao controle negativo (grupo tratado com solução salina), além disso, a variação de massa, de ambos os grupos, foram similares aos animais do grupo heterozigoto (controle positivo). No caso do grupo G118R-mGH (Figura 35C, Tabela 2), os animais não ganharam peso, apresentando diferença significativa com relação ao grupo positivo. A variação de massa desse grupo foi similar a do grupo tratado com solução salina. As equações das curvas obtidas foram para o grupo hGH: $Y = -0,5778 + 0,3939X - 0,01010X^2$ ($R^2 = 0,9518$), para o grupo mGH: $Y = -0,4875 + 0,4506X - 0,01989X^2$ ($R^2 = 0,9181$), e para o grupo G118R-mGH: $Y = -0,2472 + 0,2539X - 0,008207X^2$ ($R^2 = 0,9620$). É importante

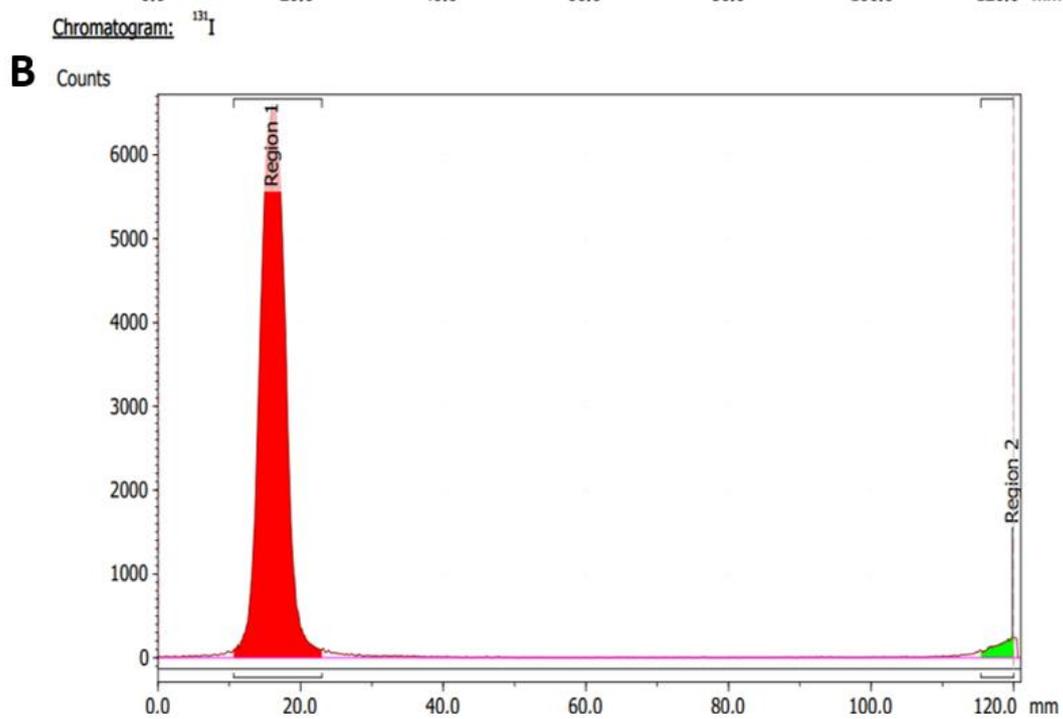
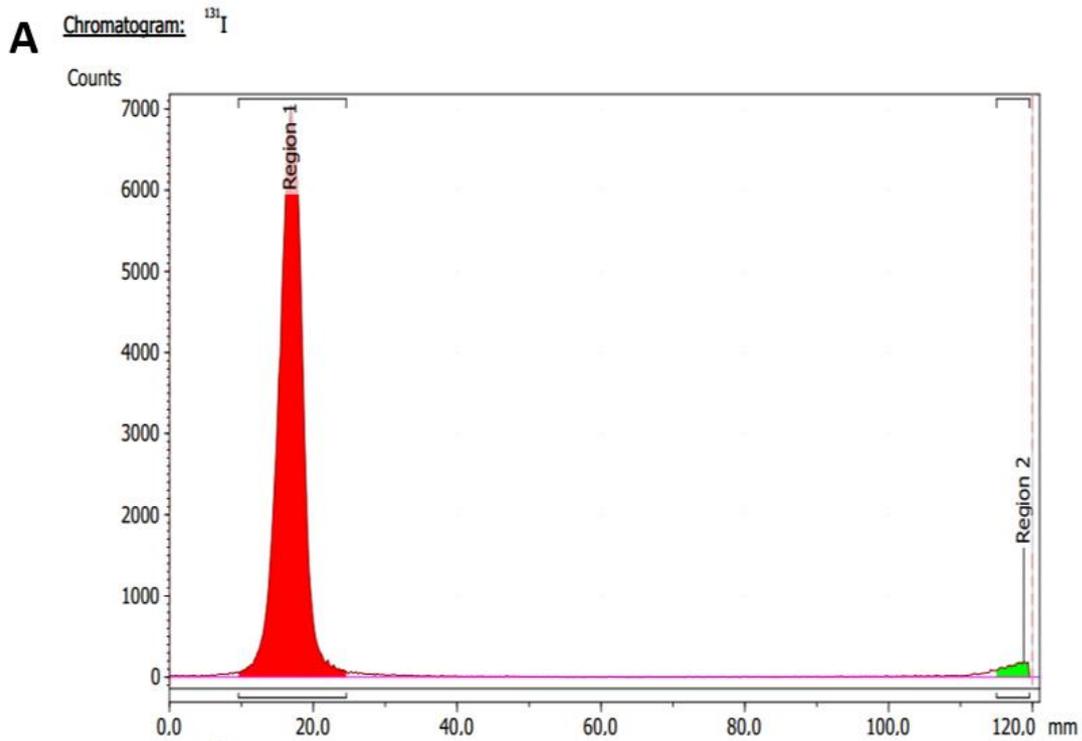
ressaltar que não houve perda de animais durante o experimento, logo o N de cada grupo se manteve.

5.5. Radiomarcção com ^{123}I e ^{131}I

O experimento de radiomarcção do mGH e do G118R-mGH com ^{131}I pelo método de Cloramina T (CLT), ocorreu conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para esse teste, foram utilizados 50 μg , tanto do mGH quanto do G118R-mGH, no tempo de 45 minutos, seguida da análise por cromatografia por SPECT, como podemos observar na Figura 36 A e B, respectivamente.

Figura 36: Cromatografia por SPECT do **(A)** mGH e do **(B)** G118R-mGH, marcados com ^{131}I em vermelho e o ^{131}I livre em verde.



Fonte: autor da dissertação

A radiomarcagem é considerada adequada quando apresenta pureza acima de 90%. No caso do mGH foi de 97,64% de marcação e de 97,53% para o G118R-mGH.

5.5.1. Estudo da estabilidade da marcação com ¹³¹I

Após a confirmação da radiomarkação, foi realizado o estudo de estabilidade do produto marcado (*in vitro*), e nesse processo 4 amostras foram diluídas em 500 µL de soro fetal bovino, e nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas após a marcação foi realizada a análise radioquímica para avaliação da estabilidade do produto. Para esse teste, foram utilizados 15 µL de cada amostra e foi realizada a avaliação da pureza por meio de cromatografia ascendente em papel, e então, a fita foi cortada no meio para medir a atividade no contador Gama (Tabela 3).

Tabela 3: Estudo de estabilidade dos produtos marcados com ¹³¹I (*in vitro*) e medição da atividade no contador Gama, de quatro amostras tanto mGH quanto G118R-mGH, nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas.

Teste de estabilidade da marcação com Iodo													
			Marcado	lodo livre		Marcado	lodo livre		Marcado	lodo livre		Marcado	lodo livre
mGH	1	1 hora após a marcação	3,30 µCi	0,76 µCi	3 horas após a marcação	3,35 µCi	0,81 µCi	6 horas após a marcação	3,4 µCi	0,7 µCi	24 horas após a marcação	3,30 µCi	0,8 µCi
	2		3,20 µCi	0,7 µCi		3,25 µCi	0,7 µCi		3,25 µCi	0,7 µCi		3,2 µCi	0,62 µCi
	3		2,75 µCi	0,55 µCi		2,8 µCi	0,6 µCi		2,8 µCi	0,6 µCi		2,8 µCi	0,7 µCi
	4		3,0 µCi	0,5 µCi		3,1 µCi	0,6 µCi		3,1 µCi	0,6 µCi		3,04 µCi	0,53 µCi
G118R-mGH	1	1 hora após a marcação	5,0 µCi	0,7 µCi	3 horas após a marcação	5,05 µCi	0,7 µCi	6 horas após a marcação	5,1 µCi	0,63 µCi	24 horas após a marcação	4,98 µCi	0,7 µCi
	2		2,0 µCi	0,5 µCi		2,3 µCi	0,5 µCi		2,77 µCi	0,43 µCi		2,07 µCi	0,55 µCi
	3		4,5 µCi	0,68 µCi		4,87 µCi	0,71 µCi		4,51 µCi	0,7 µCi		4,7 µCi	0,86 µCi
	4		3,5 µCi	0,5 µCi		3,8 µCi	0,68 µCi		3,33 µCi	0,68 µCi		3,64 µCi	0,6 µCi

Fonte: autor da dissertação

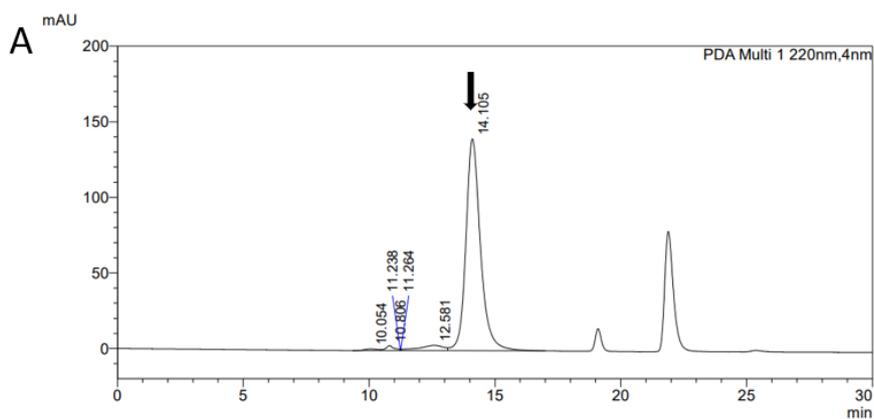
Com base nesse resultado, podemos inferir que não ocorreram mudanças significativas da atividade em nenhuma das amostras, tanto do mGH quanto do G118R-mGH, indicando uma marcação estável com o ¹³¹I. Vale destacar que o ¹³¹I possui meia vida de 8,02 dias.

5.5.2. Impactos da cloramina T

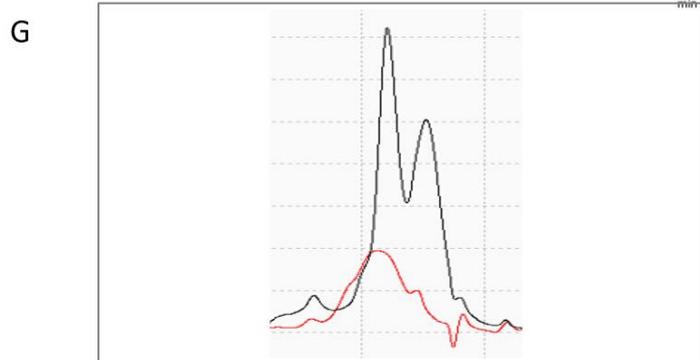
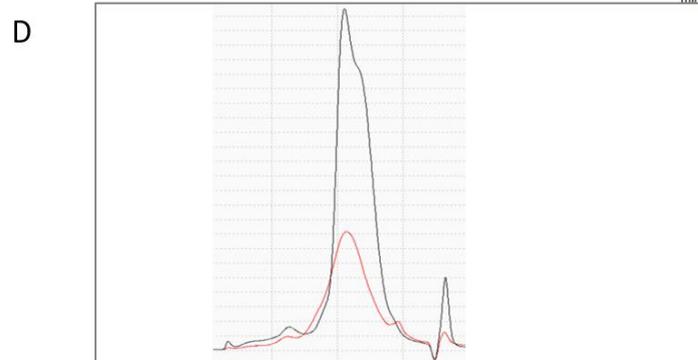
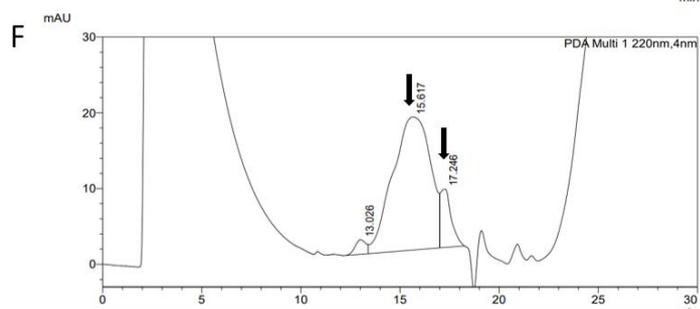
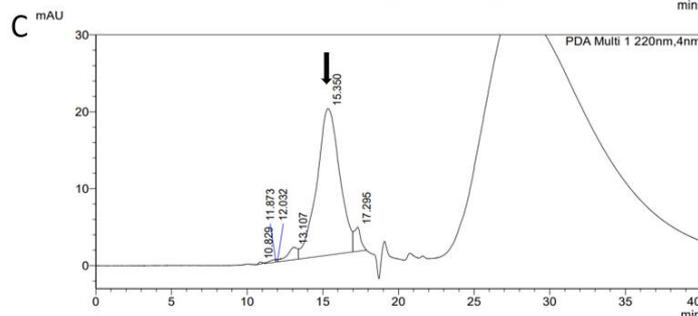
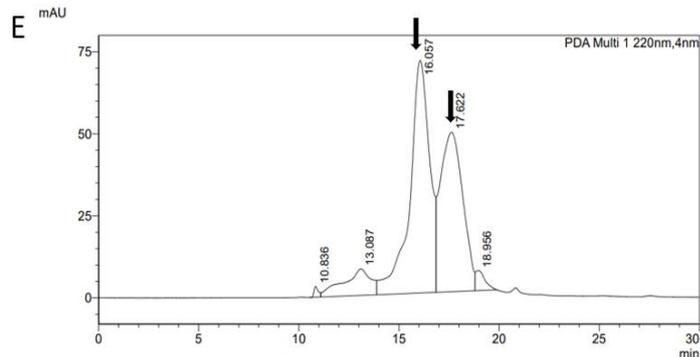
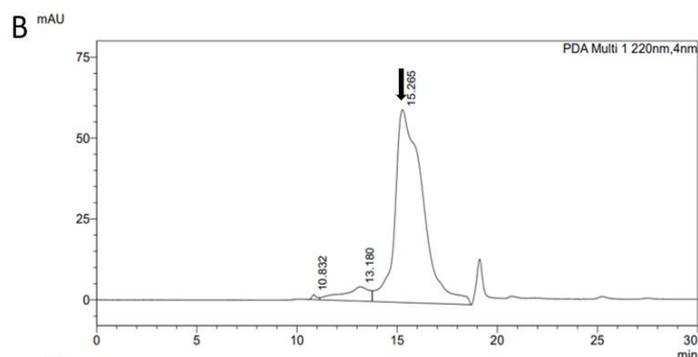
Com o intuito de realizar e avaliar da melhor forma possível a radiomarkação das proteínas, foi realizada a avaliação dos impactos da cloramina T. Nesse ensaio, podemos identificar a formação de agregados ou

formas diméricas provocadas pela reação de oxidação da CLT no mGH e G118R-mGH. Foi preparada uma solução de 50 µg, tanto do mGH quanto do G118R-mGH, com 50 µg de CLT e 100 µg de Na₂S₂O₅, no tempo de 45 minutos, seguida da análise por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão molecular (HPSEC), com leitura de absorvância no comprimento de onda de 220 nm (Figura 37).

Figura 37: Cromatogramas obtidos por HPSEC realizada para avaliação dos impactos da cloramina T. **(A)** rec-hGH (controle interno), 5 µg / 5 µL, com pico no Tr 14,10 min; **(B)** mGH – NaCl 0,9%, com pico de no Tr 15,26 min; **(C)** mGH – NaCl 0,9% com reação de CLT, com pico no Tr 15,35 min; **(D)** comparação por sobreposição da solução de mGH não tratada, em preto, e da solução do mGH com a reação de CLT, em vermelho. **(E)** G118R-mGH – NaCl 0,9%, com picos no Tr 16 min e 17,62 min; **(F)** G118R-mGH – NaCl 0,9% com reação de CLT, com picos nos Tr 15,6 min e 17,24 min; **(G)** comparação por sobreposição da solução de G118R-mGH não tratada, em preto, e da solução do G118R-mGH com a reação de CLT, em vermelho.



Fonte: autor da dissertação

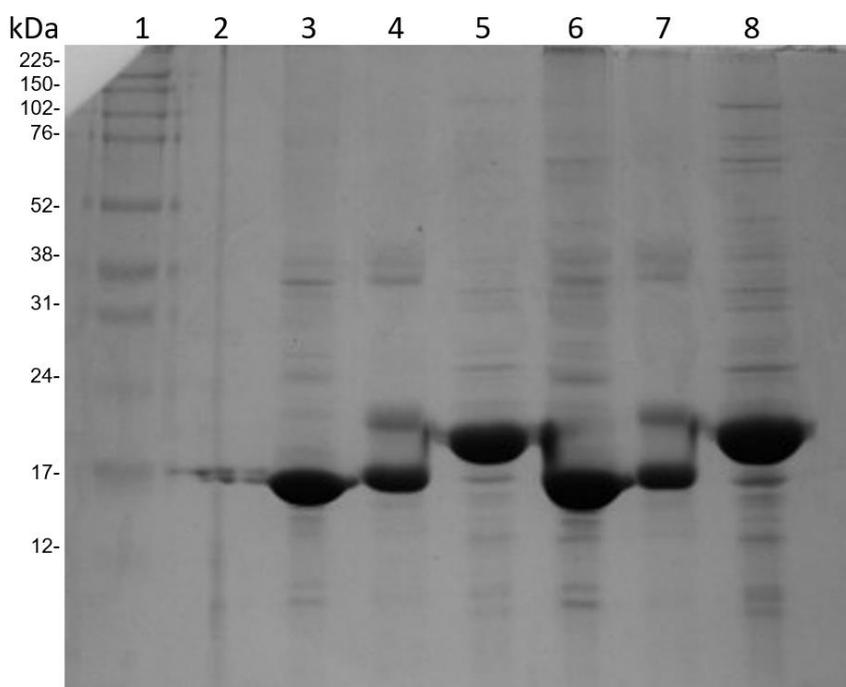


Fonte: autor da dissertação

A quantificação calculada com base na área sob o gráfico em comparação ao controle rec-hGH (Figura 37A), resultou em 10 µg/ 10 µL, com pureza de 93% do mGH que não sofreu a reação com a CLT (Figura 37B), e 3,5 µg / 12 µL, com pureza de 91,33% do mGH que sofreu a reação com a CLT (Figura 37C), resultando em uma redução de 71% de quantidade de amostra. No caso do G118R-mGH (Figura 37E), a quantificação, sem a reação com CLT, foi de 20 µg / 10 µL, com pureza de 89,45%, e do G118R-mGH que sofreu a reação com CLT (Figura 37F) resultou em 4,6 µg / 24 µL, com pureza de 97,28%, resultando em uma redução de 90,5% de quantidade de amostra. Entretanto, o T_R se manteve, de forma conservada, para ambas as proteínas, além da pureza que também se manteve estável.

Também foi realizada eletroforese em gel SDS-PAGE 15% para análise da reação dos impactos da cloramina T (Figura 38).

Figura 38: Avaliação do impacto da cloramina T, em SDS-PAGE 15% - amostras mGH e G118R-mGH. (1) marcador de massa molecular, (2) hGH 1 μ g, (3) amostra mGH-NaCl 0,9%, (4) amostra mGH-NaCl 0,9% após reação com a CLT, (5) amostra mGH-NaCl 0,9% reduzido, (6) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9%, (7) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9% após reação com a CLT, (8) amostra G118R-mGH-NaCl 0,9% reduzido.



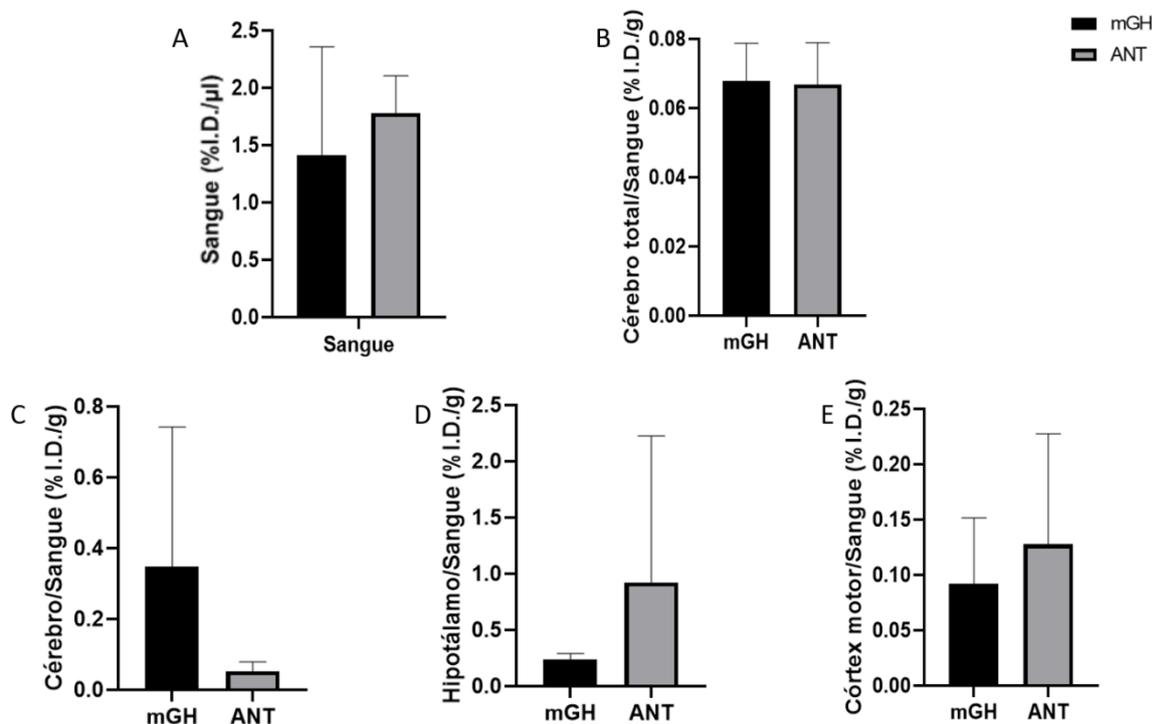
Fonte: autor da dissertação

É possível observar a diferença do peso molecular entre as bandas tratadas ou não com CLT. Conseguimos identificar bandas mais fortes, nas amostras com a reação na região superior à banda principal, podendo indicar formações de agregados da proteína. Foi realizada também a redução, com tratamento DTT (SDS-PAGE reduzido), das amostras não tratadas com CLT, tanto mGH quanto G118R-mGH (nas canaletas 5 e 8, respectivamente), para identificar isoformas clivadas, já que está aparecendo mais de uma banda.

5.5.3. Ensaio de biodistribuição - ¹³¹I

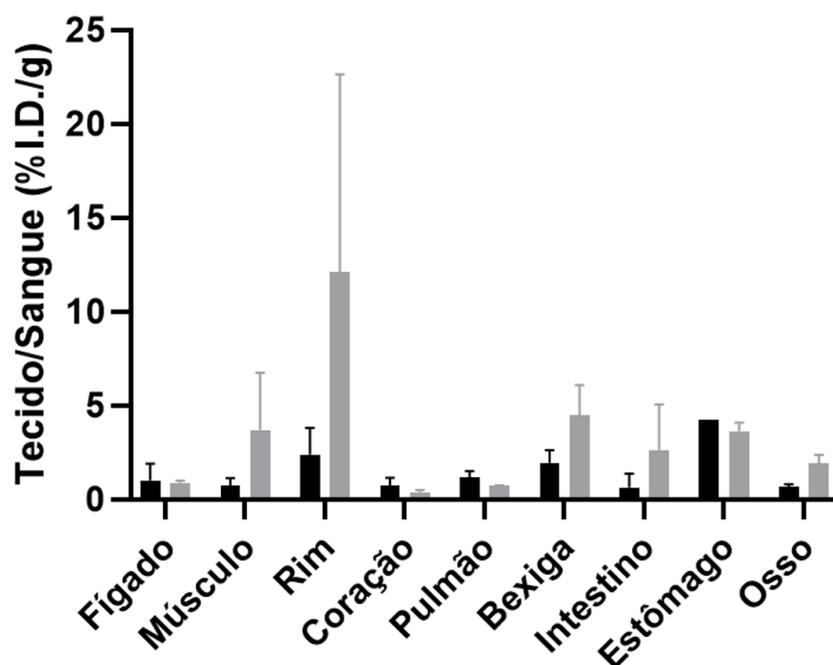
Como a marcação foi eficiente e as proteínas marcadas apresentaram uma alta pureza radioquímica, foi realizado o ensaio de biodistribuição (Figuras 39 e 40). Camundongos C57BL/6J adultos, de 6-8 semanas de vida, receberam injeção intraperitoneal dos radiomarcados, após 45 minutos realizamos a eutanásia, seguida da coleta dos tecidos, para analisar no contador Gama.

Figura 39: Ensaio de biodistribuição em camundongos, injetados com ¹³¹I-mGH (preto) e ¹³¹I-G118R-mGH (cinza), com atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto – CPM) e 0,16 µg de cada hormônio, eutanasiados após 45 minutos da injeção intraperitoneal. Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g). (A) Porcentagem da dose injetada por µL de sangue; (B) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do cérebro total; (C) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do cérebro; (D) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do hipotálamo; (E) Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) do córtex motor.



Fonte: autor da dissertação

Figura 40: Ensaio de biodistribuição em camundongos, injetados com ^{131}I -mGH (preto) e ^{131}I -G118R-mGH (cinza), com atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto – CPM) e 0,16 μg de cada hormônio, eutanasiados após 45 minutos da injeção intraperitoneal. Razão tecido/sangue da dose injetada por grama de tecido (%I.D./g).



Fonte: autor da dissertação

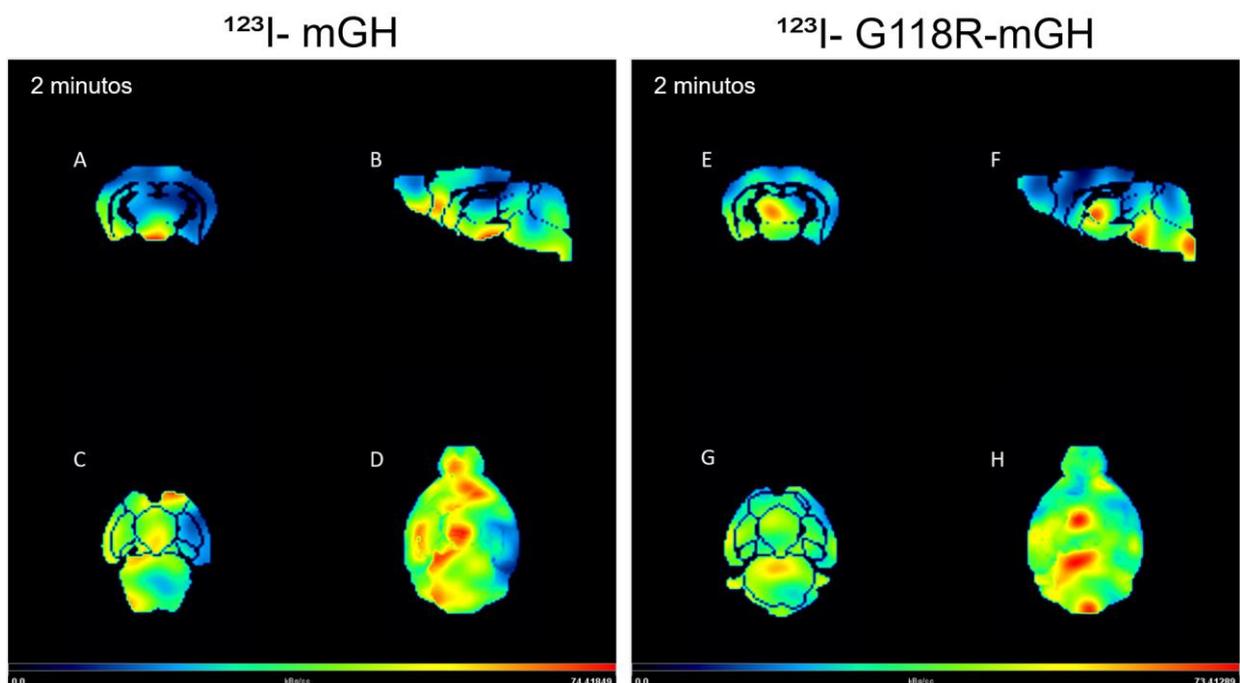
Os resultados obtidos mostram que ambas as proteínas se dispersaram para todos os órgãos, porém tanto na figura 39 quanto na figura 40 podemos observar que não houve diferença estatística entre as proteínas, em nenhum tecido, pelo teste ANOVA.

5.5.4. Ensaio de imagem por SPECT-CT - ^{123}I

Em seguida foi realizado um ensaio de imagem, por SPECT-CT, com ^{123}I , que possui meia vida de 13,3 horas, e uma energia de 159KeV. Esse estudo tem como objetivo avaliar a passagem ou não do hormônio através da barreira hematoencefálica (BHE), bem como a sua localização nas regiões anatômicas do cérebro. O ensaio foi realizado em camundongos C57BL/6J

adultos, de 6-8 semanas de vida, com injeção intraperitoneal dos radiomarcados, ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH, seguindo com a eutanásia após 2 minutos (Figura 41), 5 minutos (Figura 42) e 10 minutos (Figura 43), e foram colocadas apenas as cabeças dos animais na câmara de escaneamento e analisadas no microPET (microPETAlbira).

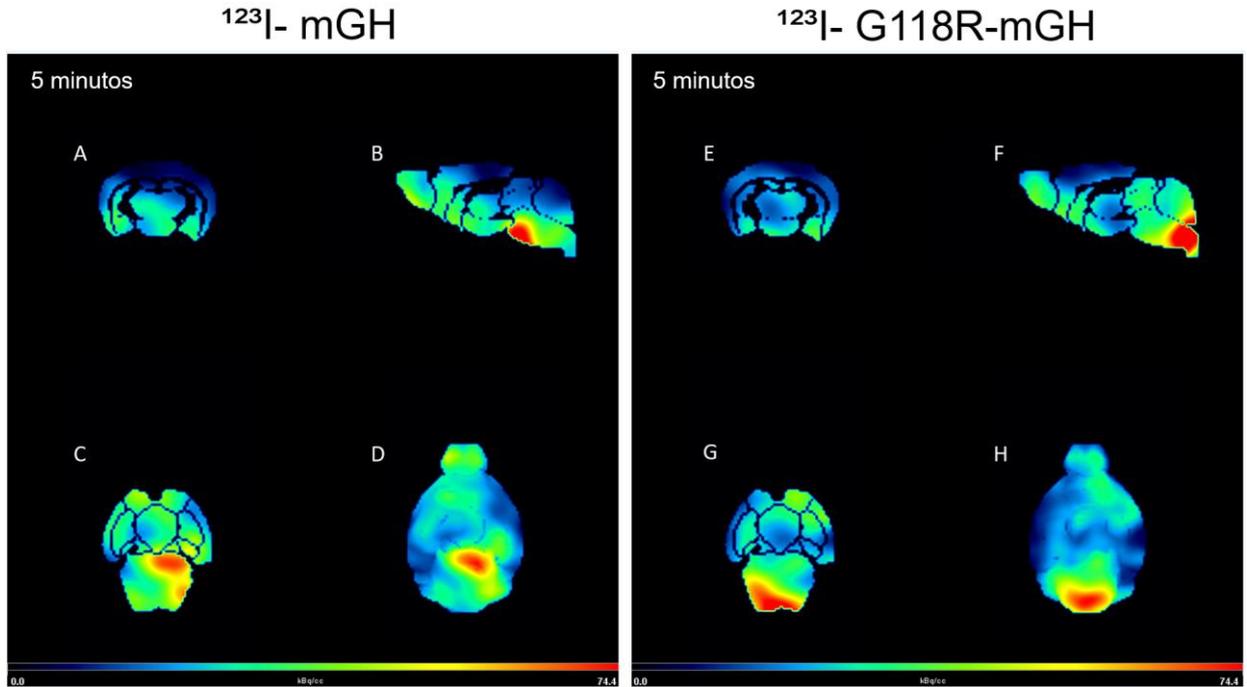
Figura 41: Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 2 minutos após a injeção de ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -mGH, (A) secção coronal; (B) secção sagital; (C) secção transversal; (D) cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -G118R-mGH, (E) secção coronal; (F) secção sagital; (G) secção transversal; (H) cérebro inteiro visto de cima.



Fonte: autor da dissertação

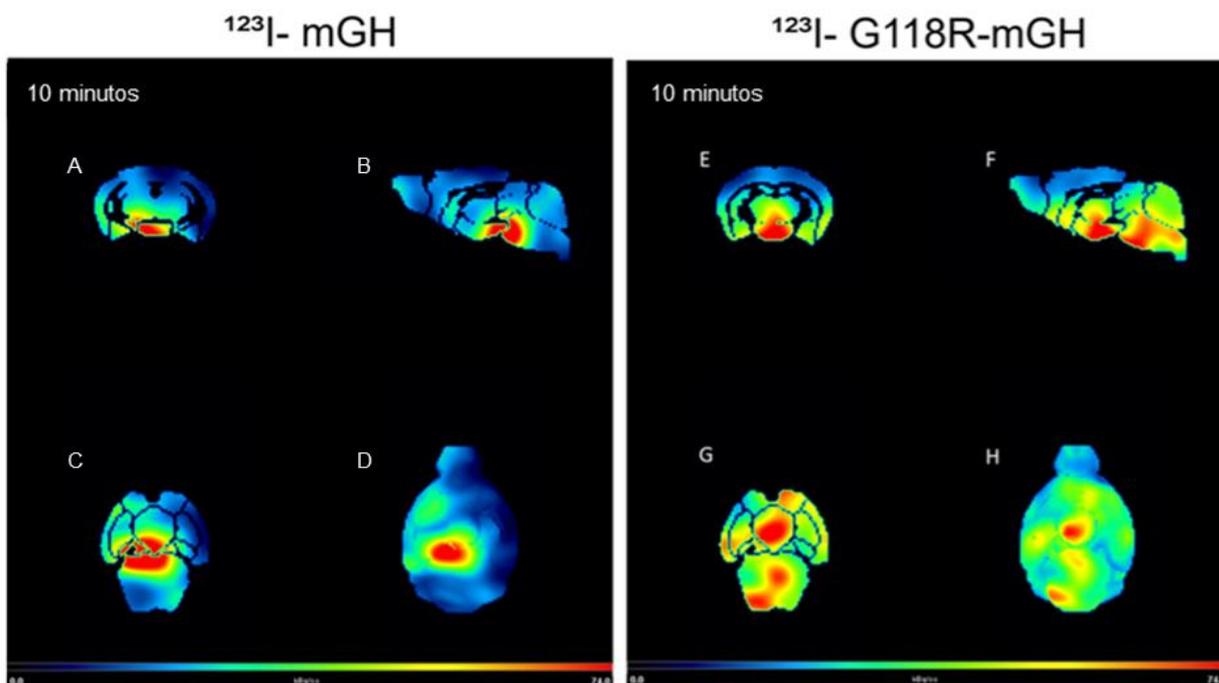
Figura 42: Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 5 minutos após a injeção de ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -mGH, (A) secção coronal; (B) secção sagital; (C) secção transversal; (D) cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -G118R-mGH, (E) secção coronal; (F) secção sagital; (G) secção transversal; (H) cérebro inteiro visto de cima.

cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -G118R-mGH, (E) secção coronal; (F) secção sagital; (G) secção transversal; (H) cérebro inteiro visto de cima.



Fonte: autor da dissertação

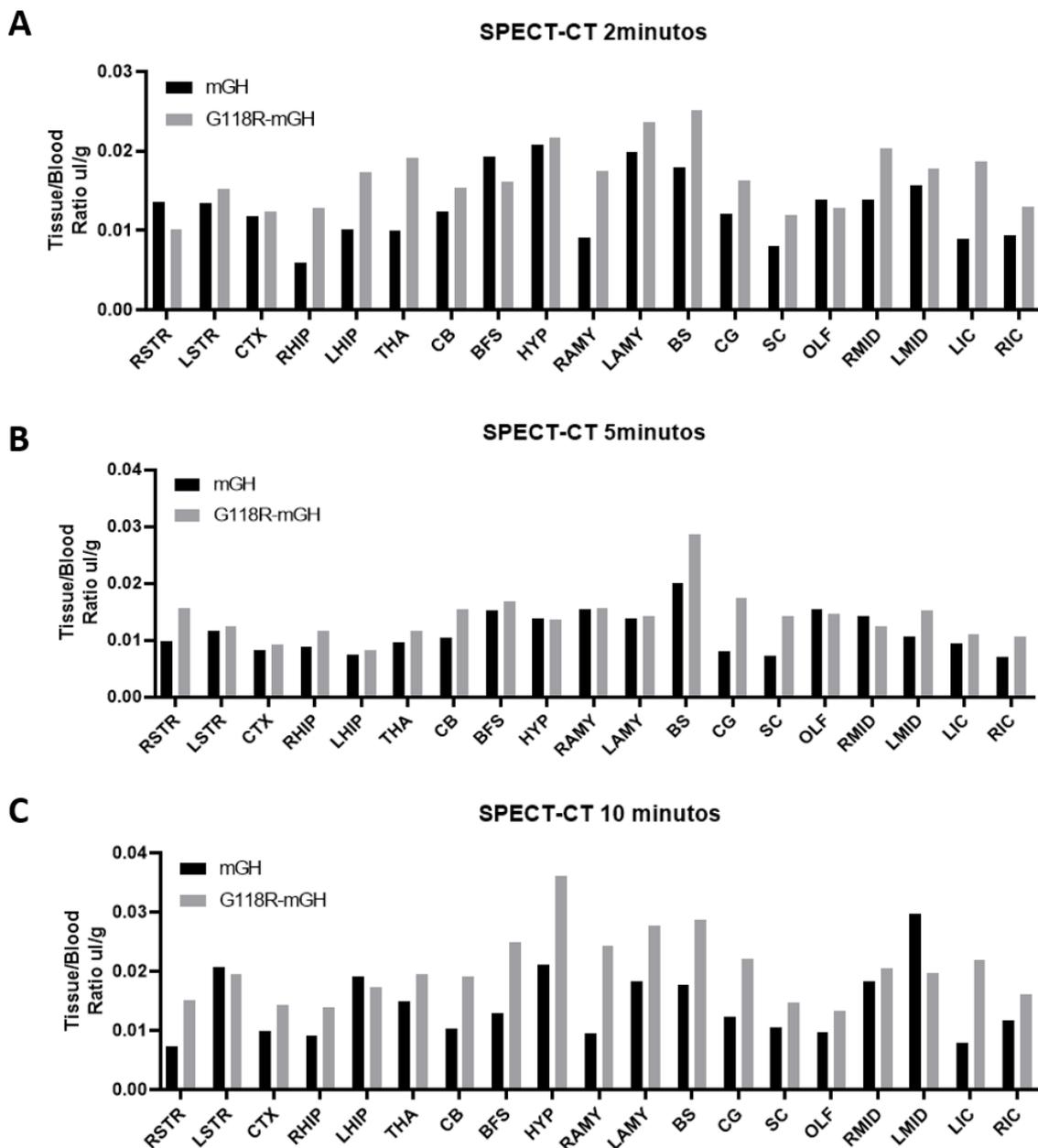
Figura 43: Imagens obtidas por tomografia por emissão de fóton único – tomografia computadorizada (SPECT-CT), dos cérebros de camundongos eutanasiados 10 minutos após a injeção de ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH. Do lado esquerdo temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -mGH, (A) secção coronal; (B) secção sagital; (C) secção transversal; (D) cérebro inteiro visto de cima. Do lado direito temos as imagens do radiomarcado ^{123}I -G118R-mGH, (E) secção coronal; (F) secção sagital; (G) secção transversal; (H) cérebro inteiro visto de cima.



Fonte: autor da dissertação

Com essas imagens conseguimos obter a localização anatômica dos radiomarcados ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH no cérebro e conseguimos observar no gráfico (Figura 44) as regiões que apresentam a média de contagem da atividade por contagem por minutos (CPM) nas diferentes regiões do cérebro.

Figura 44: Gráfico identificando a média de contagem da atividade (CPM) dos radiomarcados ^{123}I -mGH ou ^{123}I -G118R-mGH nas diferentes regiões do cérebro de camundongo eutanasiado **(A)** 2 minutos, **(B)** 5 minutos e **(C)** 10 minutos após a injeção. Na imagem estão destacadas suas respectivas regiões: RSTR: estriado direito; LSTR: estriado esquerdo; CTX: córtex; RHIP: hipocampo direito; LHIP: hipocampo esquerdo; THA: tálamo; CB: cerebelo; BFS: prosencéfalo basal e septo; HYP: hipotálamo; RAMY: amígdala direita; LAMY: amígdala esquerda; BS: tronco cerebral; CG: substância cinzenta periaquedutal; SC: colículo superior; OLF: bulbo olfatório; RMID: mesencéfalo direito; LMID: mesencéfalo esquerdo; LIC: colículo inferior esquerdo; RIC: colículo inferior direito.



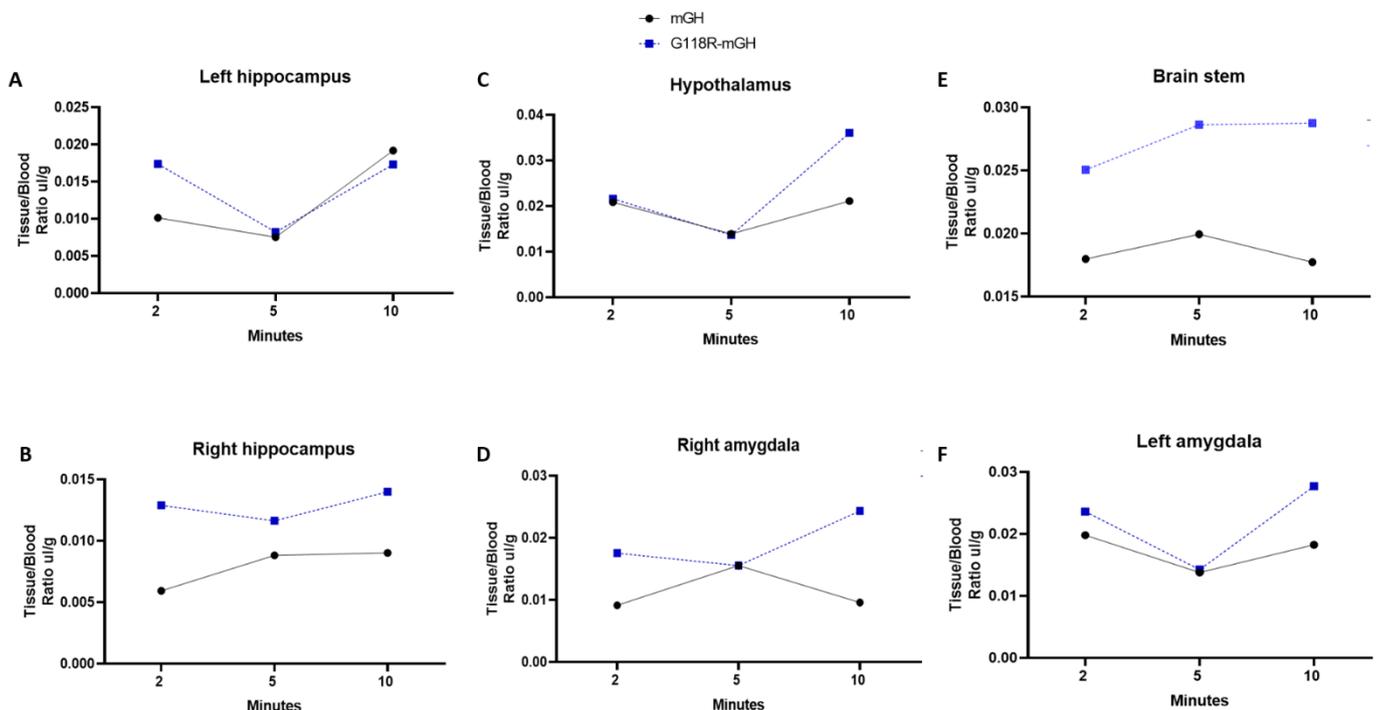
Fonte: autor da dissertação

Os resultados obtidos mostram que ambas as proteínas se dispersaram para todas as regiões do cérebro. No tempo de 2 minutos (Figura 44A), podemos observar que houve significância estatística pelo teste ANOVA de $*P= 0,0114$, e as regiões que apresentam maior contagem da atividade de ambas as proteínas foram o hipotálamo (HYP), a amígdala esquerda (LAMY) e o tronco cerebral (BS). No tempo de 5 minutos (Figura 44B), podemos observar que houve significância estatística pelo teste ANOVA de $*P= 0,0322$, e

curiosamente, a região que apresenta maior contagem da atividade de ambas as proteínas foi o tronco cerebral. No tempo de 10 minutos (Figura 44C), podemos observar que houve significância estatística pelo teste ANOVA de $**P= 0,0085$, e nesse caso, as regiões que se destacam nesse tempo e apresentam maior contagem da atividade no caso do mGH foi o mesencéfalo esquerdo (LMID), e no caso do G118R-mGH foi o hipotálamo.

Além disso, também observamos que em todos os tempos, curiosamente, o G118R-mGH apresenta maior contagem de atividade em praticamente todas as regiões, com exceção do mesencéfalo esquerdo e do hipocampo esquerdo (LHIP) no tempo de 10 minutos, conforme analisado através da cinética de permeação nas regiões (Figura 45).

Figura 45: Gráficos de análise da cinética de permeação nas regiões do cérebro, comparando ^{123}I -mGH e ^{123}I -G118R-mGH. **(A)** hipocampo esquerdo; **(B)** hipocampo direito; **(C)** hipotálamo; **(D)** amígdala direita; **(E)** tronco cerebral; **(F)** amígdala esquerda.



Fonte: autor da dissertação

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho foram discutidos em três frentes: a primeira foi em relação à expressão dos hormônios, mGH e G118R-mGH, em células humanas HEK293F cultivadas em suspensão e sua caracterização e purificação, a segunda foi com base no bioensaio em camundongos *lit/lit* e a terceira na radiomarcagem e os estudos *in vivo* de biodistribuição e imagem.

Neste trabalho, foram propostas estratégias inéditas, como o desenvolvimento de um potencial antagonista de GH murino com a mudança de aminoácido de glicina por arginina na posição 118. Essa mesma alteração foi elaborada e descrita apenas uma vez, como antagonista de GH de rato, sintetizado em *E. coli*, que obteve um efeito agonista no estudo (Helander e col., 2003). Além disso, outras estratégias foram propostas com o intuito de introduzir metodologias atuais e de melhorar a eficiência na expressão de hormônios murinos utilizando células humanas, seguindo com uma purificação e caracterização adequada para tais hormônios, radiomarcagem e finalizando com ensaios preliminares *in vivo*. É importante enfatizar que existe uma dificuldade na obtenção de mGH no mercado e que existe uma importante necessidade de se realizar estudos com modelos de hormônios homólogos (espécie-específico), como foi dito anteriormente. De modo geral, os objetivos do trabalho foram alcançados.

6.1. Expressão, caracterização e purificação do mGH e G118R-mGH

A escolha do plasmídeo pcDNA 3.4 (GenScript Biotech, Piscataway, NJ, EUA) confirmou a expectativa de ótimos níveis de expressão de proteínas recombinantes. Vale lembrar que é um vetor constitutivo de mamífero produzido para proporcionar altos níveis de produção. Em trabalhos anteriores do grupo, esse vetor foi utilizado para síntese de TSH e expressão de hPRL e se mostrou eficiente (Sant'Ana e col., 2018; Silva e col., 2019). Nesse trabalho, foi realizada a síntese e expressão transiente do mGH e G118R-mGH, em células HEK293F cultivadas em suspensão.

Podemos confirmar também que a metodologia da expressão transiente em células de mamífero (HEK293F) cultivadas em suspensão foi muito eficiente na obtenção dos hormônios recombinantes, proporcionando altos níveis das proteínas de interesse. Esse fato possibilitou a continuidade do trabalho, uma vez que foram obtidas concentrações de mGH: ~1mg/10mL de meio de cultura, e de G118R-mGH: ~1,6mg/10mL de meio de cultura, e ao final foram obtidos produtos com purezas adequadas para os estudos propostos. Os valores alcançados, de ambas as proteínas, foram relativamente similares a outros trabalhos realizados com expressão transiente em células de mamífero (Peroni e col., 2002; Mendonça e col., 2005; Oliveira e col., 2008; Damiani e col., 2013; Sevilhano e col., 2017; Silva e col., 2019). Além disso, é importante lembrar alguns trabalhos importantes sobre síntese de proteínas recombinantes produzidas em linhagens de células humanas (Zhang e col., 2010; Swiech e col., 2012; Fliedl e col., 2015; Bouvette e col., 2018; Hu e col., 2018; Zhong e col., 2019).

A síntese de mGH já foi reportada anteriormente em *E. coli*, produzida em corpos de inclusão (IC), portando uma metionina inicial (Fradkin e col., 2010). O mGH também já foi expresso em células de mieloma murino transfectadas com um vetor contendo o gene da glutamina sintetase e o cDNA do GH de camundongo ou rato. Esse estudo foi bastante focado no cultivo das células em larga escala, porém a caracterização do mGH não foi descrita (Zhou e col., 1996). A síntese do antagonista de G118R-mGH ainda não foi descrita na literatura. Já outros antagonistas de GH, baseados na troca de aminoácidos glicina pela arginina em uma região muito conservada e relacionada ao sítio 2 da ligação ao GHR já foram relatados: antagonista de rato G118R-rGH produzido em *E. coli* (Helandera e col., 2003), no entanto, nesse estudo, utilizando um modelo experimental *in vitro* e avaliando a indução de células do mRNA de CYP2C12 e IGF-1 em cultura primária de hepatócitos de ratos a ação não foi confirmada; de galinha G119R-chGH produzido em *E. coli* (IC) (Paczoska-Eliasiewicz e col., 2006); de bovino G119R-bGH produzido em células L de camundongos (Chen e col., 1991); e de humano G120R-hGH produzido em células CHO (Haldankar e col., 1999).

Com relação ao processo de caracterização e purificação do mGH e G118R-mGH, como já escrito anteriormente, ambos apresentaram uma quantidade e pureza suficiente para realizar os ensaios *in vivo*. A resina Q-Sepharose Fast Flow se mostrou ser muito eficiente no processo de purificação, que em seguida conseguimos confirmar na coluna de exclusão molecular (HPSEC). Porém é importante dizer que não conseguimos realizar a análise por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), uma vez que as proteínas aparentavam estar degradadas nessa etapa, incluindo o controle de mGH (NIH). Porém, essa etapa é muito utilizada no processo de caracterização de proteína, como podemos observar em muitos trabalhos do próprio grupo (Oliveira e col., 1999; Oliveira e col., 2003; Mendonça e col., 2005; Oliveira e col., 2008; Heller e col., 2010; Damiani e col., 2013; Silva e col., 2019).

Para finalizar esse processo, foi realizado o MALDI-TOF para determinação da massa molecular (Andersen e col., 1996; Roepstorff, 1997; Mann & Jensen, 2003). Os resultados obtidos mostraram, no caso do mGH, que a massa molecular apresentou menor que o esperado em teoria (21839,87 Da), com 21735,925 Da, uma diferença de 103,945 Da, podendo, ser possivelmente, uma questão de calibração do equipamento, considerando que essa variação também foi observada para outras proteínas conhecidas e analisadas em estudos paralelos. Ou então, poderia ser, possivelmente, uma perda de um aminoácido cisteína.

O G118R-mGH, está com uma massa molecular de 21828,982 Da, sendo que a alteração do aminoácido glicina para arginina deixa a massa molecular um pouco maior quando comparado com o mGH, de 21939 Da, bem próximo do valor teórico de 93,1 Da. Nesse resultado obtido, a massa molecular também apresentou valor menor do que o teórico esperado, com uma diferença de 110,018 Da.

Como a expressão foi realizada em células de mamífero, em ambas as proteínas, poderia ter ocorrido alguma modificação pós-traducional (MPT), como já descrito anteriormente, na finalização da síntese proteica (Mann & Jensen, 2003), podendo ser uma glicosilação, fosforilação ou até uma hidroxilação (Burlingame, 1996; Roepstorff, 1997; Mann & Jensen, 2003),

porém se fosse o caso, aumentaria a massa molecular. Dessa forma, possivelmente, ocorreu uma degradação de ambas as proteínas.

Dessa forma, se faz necessário investigar e entender mais a fundo essas técnicas de caracterização dessas proteínas.

6.2. Bioensaio com camundongos *lit/lit*

A genotipagem dos animais foi necessária, como uma etapa preliminar do estudo (Lima e col., 2020), importante para identificação da mutação *little*, já que realizar o cruzamento aleatório (observando apenas o fenótipo) pode não ser o suficiente e adequado, além da necessidade de utilizar filhotes para a experimentação, dificultando ainda mais identificar o fenótipo apenas observando.

Nesse trabalho, a análise da atividade biológica, tanto do mGH quanto G118R-mGH, em camundongos anões *lit/lit*, foi de extrema importância. Inicialmente foi necessário determinar a quantidade de proteína recombinante, com injeção intraperitoneal, que seria usada nos testes. Em nosso grupo, foram realizados alguns experimentos com hGH que mostraram uma diminuição de expressão proteica em doses acima de 50 µg de plasmídeo administrado, possivelmente em razão de um efeito de saturação (Oliveira e col., 2010), como já havia sido reportado anteriormente em outros estudos (Golzio e col., 2004; Fattori e col., 2005). Entretanto, outros trabalhos do nosso grupo, com hGH, mostraram que doses menores de 5 µg/dia e 10 µg/dia, tiveram uma performance melhor, além da dose de 10 µg/dia ter se mostrado ideal para esse experimento, durante a padronização e utilização desse bioensaio (Bellini & Bartolini, 1993; Peroni e col., 2012; Higuti e col., 2012). Além disso, já havia sido observado que a administração intraperitoneal da dose mencionada acima, de rec-hGH, o resultado já seria evidente no décimo dia (Bellini e col., 2003; Oliveira e col., 2010; Higuti e col., 2012).

Essas informações se confirmaram no bioensaio, onde as doses administradas, via intraperitoneal, tanto do controle hGH, quanto do mGH e G118R-mGH, foram de 10 µg/dia, durante 10 dias. É importante enfatizar que

esse ensaio é inédito para proteína de camundongo recombinante e de seu antagonista.

A curva de variação de massa, no caso do controle positivo hGH se mostrou semelhante aos dos camundongos heterozigotos, sem tratamento, e ambas as curvas apresentaram diferenças estatísticas significativas, quando comparadas com à curva dos animais que receberam solução salina ($P < 0,0001$), o que já era esperado. No caso do grupo mGH, a curva também se mostrou semelhante aos dos camundongos heterozigotos, sem tratamento, e ambas as curvas demonstraram diferenças estatísticas significativas, quando comparadas com à curva dos animais que receberam solução salina ($P < 0,0001$), mostrando um ótimo resultado, se comparado com o controle hGH. Já no caso do G118R-mGH, a curva, curiosamente, se mostrou semelhante aos dos camundongos que receberam solução salina, e ambas as curvas demonstram diferenças estatísticas altamente significativas em relação aos camundongos heterozigotos, sem tratamento ($P= 0,0137$). A partir desses resultados, podemos observar que o G118R-mGH apresentou um resultado diferente se comparado com o mGH e hGH.

Ainda assim, embora os resultados tenham sido muito promissores, esse bioensaio se encontra em fase inicial e há a necessidade de uma continuidade, visando um aprimoramento na metodologia, fazendo testes com diferentes doses de ambas as proteínas, para determinação da dose mais apropriada. Após esse processo, já com a dose estabelecida e padronizada, deverá ser realizado um estudo administrando tanto o mGH quanto o G118R-mGH juntos, para realmente avaliar se o G118R-mGH está antagonizando. O G118R-mGH também pode ser administrado em camundongos heterozigotos, para análise de sua ação. Estudos pós bioensaio, também se fazem necessário, como por exemplo, ensaio imunológico, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para mensurar a atividade imunológica das proteínas.

6.3. Radiomarcção e os estudos *in vivo* de biodistribuição e imagem

O ensaio de radiomarcção se mostrou eficiente, levando em consideração a quantidade de material disponível na solução e o tempo da reação. Existem vários métodos para realizar a radiomarcção de proteínas com ^{131}I , e muitos deles são aplicados em hormônios (Yalow & Berson, 1960). Durante o desenvolvimento dessas técnicas, foi utilizada a radiomarcção do GH com a CLT alcançando 70% de rendimento da proteína marcada com o uso de 74 MBq de ^{131}I , e uma pequena quantidade de proteína 5 μg (Greenwood e col., 1963). Em outro estudo foi observado que um uso de alta dose de radioatividade para pouca proteína, e 100 μg de CLT, resultou em um baixo grau de substituição química na reação, e assim a CLT causou danos na proteína, sendo que a partir de 18 MBq/ μg existe uma perda progressiva da atividade imunológica do hormônio (Banerjee & Gibson, 1962). Outro estudo mostrou a radiomarcção do hGH com ^{125}I , utilizando atividade de 37 MBq em 20 μg de hormônio e 0,88 μg , resultou em 80% de rendimento (Biscayart e col., 1989).

Em nosso grupo, foram realizados estudos de radiomarcção com ^{123}I , com hormônio de crescimento porcino (pGH) com diferentes concentrações de hormônio e de CLT, e com diferentes tempos de reação. Foi observado que o melhor rendimento da marcação ocorreu quando foram usados 50 μg da proteína, com 50 μg de CLT e 45 minutos de tempo de reação, com uma eficiência de 95% (Menezes, 2023). Neste trabalho conseguimos confirmar esses resultados, realizando a marcação das proteínas com ^{131}I usando a mesma estratégia descrita acima, gerando um rendimento de 97,64% do mGH e 97,53% do G118R-mGH. Esse resultado mostra uma alta eficiência da marcação, restando menos de 3% de iodo livre, além disso, o cálculo da atividade específica, considerando um átomo de iodo/molécula, ficou aproximadamente 5,55 MBq/ μg .

A integridade e estabilidade das moléculas são de extrema importância para que os resíduos de tirosina estejam livres e aptos para a interação com o radioisótopo de iodo e para que se preserve a ação biológica e imunológica (Berndt e col., 2018; Harada e col., 2020). Neste estudo, foram realizados os testes de estabilidade da marcação e impactos da CLT, e como resultado não ocorreram mudanças significativas da atividade em nenhuma das amostras,

tanto do mGH quanto do G118R-mGH, em até 24 horas. Porém, foi possível identificar a formação de agregados ou formas diméricas provocadas pela reação de oxidação da CLT, a partir da técnica de HPSEC, além de obter uma redução de 71% de quantidade de amostra do mGH e de 90,5% de quantidade de amostra do G118R-mGH. Entretanto, o T_R se manteve, de forma conservada, para ambas as proteínas, além da pureza que também se manteve estável. No gel SDS-PAGE podemos identificar possíveis formações de agregados da proteína.

Muitos estudos já foram realizados sobre os efeitos da iodação em várias proteínas e hormônios e sempre ocorre uma concordância sobre a permanência da atividade imunológica do hGH e bGH (Mattera & Dellacha, 1982; Sharp & Pierce, 1985), sendo que foram realizados ensaios biológicos para confirmação da mesma, como estudos da alteração de iodação da lactoperoxidase, em células Nb2 (Hughes e col., 1982). Outro estudo *in vitro* mostrou que em níveis moderados de iodação, o hGH manteve sua ação fisiológica (Goodman & Levy, 1983).

No nosso grupo, foi mostrado que com concentrações altas de CLT, de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e altos graus de iodação, com até 2,7 átomos/molécula, não são alteradas de forma significativa a atividade imunológica e biológica do hGH (Bartolini & Ribela, 1986). Contudo, no presente trabalho, o radiomarcado foi imediatamente usado após a sua preparação.

A partir da radiomarcagem e de toda análise, foi confirmada a ligação do ^{131}I -mGH e ^{131}I -G118R-mGH através do ensaio de biodistribuição, administrando uma atividade de 0,12 MBq (1 milhão de contagem por minuto – CPM) e 0,16 μg de cada hormônio, quando os camundongos foram eutanasiados após 45 minutos da injeção intraperitoneal, para avaliar a taxa de captação dos tecidos.

Existem estudos que mostram que a meia vida do GH no plasma é curta, e tem uma rápida depuração quando está sozinho ($t_{1/2} = 11 - 20$ minutos), porém quando se associa à proteína de ligação (GHBP), sua meia vida é prolongada ($t_{1/2} = 80 - 137$ minutos) (Fisker, 2006; Donato e col., 2021). Em rato, foi identificado que a meia vida do GH é 82,7 - 119,5 minutos, quando

associado com a proteína de ligação GHBP (Amit e col., 1993). Essas informações são importantes para entender a disponibilidade do GH no sangue e o tempo de sua internalização nos tecidos através da ligação ao receptor. A meia vida do receptor de coelho e rato, também é curta ($t_{1/2} = 29,7 - 44,5$ minutos) (Amit e col., 1993). Dessa forma, analisando essas informações, podemos considerar que a eutanásia após 45 minutos da injeção se mostra um intervalo adequado para o experimento, embora seja interessante testar diferentes tempos, para entender melhor a farmacodinâmica dessas proteínas.

Neste trabalho, o ensaio de biodistribuição mostrou que ambas as proteínas se dispersaram de forma similar para todos os órgãos, porém não houve diferença estatística entre as proteínas, em nenhum tecido. Observamos, nos dois casos, que alguns tecidos apresentam uma maior contagem em alguns tecidos como rim, bexiga, estômago, possivelmente, relacionada à excreção do GH. Quando avaliamos a biodistribuição no cérebro, também não houve diferença estatística entre as proteínas, porém, curiosamente, quando avaliamos a contagem do cérebro total identificamos um nível elevado dos dois radiomarcados, entretanto quando o hipotálamo é analisado separadamente podemos observar que na contagem dos níveis dos radiomarcados houve uma diminuição. Uma possível explicação seria que o acesso dessas proteínas, entre sangue e SNC, se faz por difusão simples, já que essa passagem ocorre de forma rápida, em menos de 45 minutos, e assim, sem a necessidade do receptor. Entretanto, se faz necessário a continuidade desses estudos.

Com a finalidade de entender melhor a dispersão dessas proteínas no cérebro, foi realizado um ensaio para obter imagens da localização anatômica do mGH e G118R-mGH por SPECT-CT. Os resultados obtidos revelaram a presença de ambos radiomarcados em diversas regiões do cérebro. Observamos que em apenas 2 minutos já ocorreu a internalização e dispersão das proteínas, reforçando a hipótese acima. É importante ressaltar a significância estatística quando se compara ambas as proteínas, além de ter uma significância estatística alta em relação aos diferentes tempos. Dessa forma, em 2 minutos obtivemos uma diferença estatística com significância de $*P = 0,0114$, com 5 minutos obtivemos uma diferença estatística com

significância de $*P= 0,0322$, e com 10 minutos obtivemos uma diferença estatística com significância de $**P= 0,0085$. A contagem de atividade nas regiões varia entre os tempos, sendo que em 2 minutos as maiores atividades estão no hipotálamo, a amígdala esquerda e o tronco cerebral. Em 5 minutos a maior atividade está no tronco cerebral. Já no tempo de 10 minutos as maiores atividades estão no mesencéfalo esquerdo, no caso do mGH, e no hipotálamo, no caso do G118R-mGH.

Com relação à atuação do GH nessas regiões, sua localização no hipotálamo tem como atuação em neurônios hipofisiotrópicos que regulam a secreção hipofisária do próprio GH por meio de *feedbacks* negativos curtos, além de atuar na resposta ao estresse (Donato e col., 2021). No caso da amígdala sua atuação regula os comportamentos, emoções, informações límbicas e monitoramento de valência (Donato e col., 2021). Além disso, outros estudos descrevem um eixo grelina-GH na amígdala, para controle da formação da memória do medo, como transtorno de estresse pós-traumático (Meyer e col., 2014; Gisabella e col., 2016). No caso do mesencéfalo, é uma região que conecta o cerebelo e tronco encefálico, que são regiões muito importantes para a ação do GH. No caso do cerebelo, é uma região que possui uma grande quantidade de GHR, principalmente nas células purkinje. Dessa forma, caso ocorra uma degeneração cerebelar, o GH atua no processo de neurodegeneração da região, inclusive restaurando as funções motoras (Lincoln e col., 1994; Wu e col., 2020). No caso do tronco cerebral, sua atuação está vinculada com a regulação da respiração e resposta ventilatória à hipóxia (Furigo e col., 2017; Wasinski e col., 2020; Silva e col., 2022). Outra região importante em que o GH atua é o hipocampo, melhorando na função de memória e aprendizado espacial, através da manutenção celular e induzindo a plasticidade sináptica (Juarez-Aguilar e col., 2022).

Com os resultados obtidos nos experimentos, embora a hipótese da passagem das proteínas, entre sangue e SNC, não depende do receptor, seja válida, ainda é necessário estudar mais a fundo essa questão, já que ainda existem muitas dúvidas sobre como ocorre a passagem de proteínas pela BHE.

Observamos também, que em todos os tempos avaliados, curiosamente, o G118R-mGH apresenta maior contagem de atividade em praticamente todas

as regiões, com exceção do mesencéfalo esquerdo e do hipocampo esquerdo no tempo de 10 minutos, conforme analisado através da cinética de permeação nas regiões. É possível que quando o GH se liga ao receptor, inicie uma via de degradação que dissocia o iodo, logo a contagem da atividade do ^{123}I -mGH passa a ficar menor quando comparada com a do ^{123}I -G118R-mGH. Além disso, o G118R-mGH se mantém na região extracelular, lembrando que é esperado que essa molécula não seja internalizada pela célula. Esse resultado, de certa forma, faz sentido, já que entre todas as regiões cerebrais que expressam GHR indicadas neste estudo, a região hipotalâmica é a mais responsiva ao GH, considerando núcleos chaves como ARH, PVH, VMH, DMH, e dos neurônios AgRP, como podemos observar no resultado no tempo de 10 minutos.

A metodologia de radiomarcção apresentou alta eficiência na obtenção de radiomarcados. No caso dos ensaios *in vivo*, obtivemos resultados muito promissores, porém ambos se encontram em fase inicial e necessitam de continuidade do estudo. Seria importante demonstrar a farmacocinética das proteínas, utilizando tempos diferentes de eutanásia, aumentando o número de animais, para uma avaliação estatística mais precisa, e realizar ensaio de imunohistoquímica para confirmar como ocorre o transporte do GH no cérebro.

7. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi realizada a produção de mGH e de seu antagonista G118R-mGH, com uma mutação, em um aminoácido bastante conservado, e uma síntese inédita de ambos os produtos utilizando células humanas cultivadas em suspensão.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a escolha do vetor plasmidial pcDNA 3.4 TOPO demonstrou ser uma opção viável para a síntese de proteínas recombinantes. Além disso, a técnica de produção foi efetiva na expressão transiente de mGH e G118R-mGH proporcionando uma quantidade de material final, com pureza, aceitável para estudos em animais, a partir dos resultados da caracterização e purificação por sistemas de cromatografia.

O bioensaio realizado com camundongos *lit/lit* para avaliação biológica do mGH e G118R-mGH foi efetivo e a atividade biológica ou potência do mGH, do controle positivo hGH e do grupo heterozigoto apresentaram resultados similares, já o G118R-mGH não apresentou atividade nas condições estudadas. No entanto, para confirmar uma atividade inibitória ou antagonista do G118R-mGH são necessários mais estudos. Logo, esse estudo se encontra em fase inicial e possui a necessidade de uma continuidade, visando um aprimoramento na metodologia, principalmente em relação à quantidade injetada e o intervalo das aplicações.

Com relação aos testes de radiomarcção do mGH e do G118R-mGH com ^{131}I e ^{123}I , a metodologia apresentou alta eficiência, de acordo com o resultado da cromatografia por SPECT, ultrapassando uma porcentagem de pureza acima de 90%.

A atuação do GH no SNC e seu transporte da corrente sanguínea pela BHE, estão cada vez mais sendo investigados, porém ainda existe uma dificuldade em obter respostas claras. Quanto aos ensaios *in vivo*, de biodistribuição e SPECT-CT, embora se encontrem em fases iniciais e possuem a necessidade de uma continuidade, podemos concluir que existe uma diferença de atividade entre mGH e G118R-mGH e que isso, possivelmente, está relacionada com o GHR, deixando claro a sua importante ação sobre as regiões cerebrais responsivas ao GH.

Em geral, os ensaios desenvolvidos nesse trabalho possibilitam novas concepções e aplicações metodológicas, visando não só a produção, mas também uma melhor compreensão da ação fisiológica do mGH e G118R-mGH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A.; DOLMAN, D. E.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010.

ALBA, M.; FINTINI, D.; SALVATOI, R. Effects of recombinant mouse growth hormone treatment on growth and body composition in GHRH knock out mice. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 4, p. 275-282, 2005.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. *Biologia molecular da célula*. **Artmed Editora**, 2010.

AMIT, T.; BARKEY, J. R.; YODIM, B. M.; HOCHBERG, Z. Modulation of human growth hormone binding to somatogenic and lactogenic receptors by monoclonal antibodies to human growth hormone. ***Cell Signaling***, v. 5, p. 555–558, 1992.

AMIT, T.; HARTMANN, K.; SHOSHANY, G.; BARUCH, Y.; YODIM, M. B.; HOCHBERG, Z. The turnover of growth hormone (GH)-binding protein and GH receptor in rabbit and rat. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, v. 94, n. 2, p. 149-54, 1993.

ANDERSEN, J. S.; SVENSSON, B.; ROEPSTORFF, P. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. ***Nature Biotechnology***, v. 14, n. 4, p. 449-57, 1996.

ANDREWS, T. M.; ANDREWS, W. W.; BAKER, C. An investigation into the removal of enzymes from paper following conservation treatment. ***Journal of the American Institute for Conservation***, v. 31, n. 3, p. 313-323, 1992.

BANERJEE, R. N.; GIBSON, K. Preparation and purification of high specific activity insulin-131-iodine. ***The Journal of Endocrinology***, v. 25, p. 145-6, 1962.

BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Influence of chloramine T iodination on the biological and immunological activity or the molecular radius of the human growth hormone molecule. ***Journal of Immunoassay***, v. 7, n. 3, p. 129-38, 1986.

BASS, S. H.; MULKERRIN, M. G.; WELLS, J. A. A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA***, v. 88, n. 10, p. 4498-502, 1991.

BAUMANN, G.; SHAW, M.; AMBUN, K.; JAN, T.; DAVILA, N.; MERCADO, M.; STOLAR, M & MACCART. Heterogeneity of circulating growth hormone. ***Nuclear Medicine and Biology***, v. 21, p. 369–379, 1994.

BAUMANN, G. Growth hormone binding protein. ***Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism***, v. 14, n. 4, p. 355-75, 2001.

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

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

BELLINI, M. H., PERONI, C. N., & BARTOLINI, P. Increases in weight of growth hormone – deficiente and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH – secreting, primary human keratinocytes. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 15, p. 2322-4, 2003.

BERNDT, N.; BERGMANN, R.; BACHMANN, M. Radiolabeling and analysis of labeled proteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 1853, p. 281-285, 2018.

BISCAYART, P. L.; PALADINI, A. C.; VITA, N.; ROGUIN, L. P. Preparation of ¹²⁵I-labeled human growth hormone of high quality binding properties endowed with long-term stability. **Journal of Immunoassay**, v. 10, n. 1, p. 37-56, 1989.

BOMMER, J.; ALEXIOU, C.; MULLER-BUHL, U.; EIFERT, J. & RITZ, E. Recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients-dose determination and clinical experience. **Nephrol Dial Transplant**, v. 2, p. 238-42, 1987.

BOUVETTE, J.; KORKUT, D. N.; FOUILLEN, A.; AMELLAH, S.; NANJI, A.; DUROCHER, Y.; OMICHINSKI, J. G.; LEGAULT, P. High-yield production of human Dicer by transfection of human HEK293-EBNA1 cells grown in suspension. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 76, 2018.

BUCHMAN, M.; Bell, S & Kopchick, JJ. Growth Hormone Discovery and Structure. **Pediatric endocrinology reviews: PER**, 16 (Suppl 1), p. 2–10, 2018.

BURLINGAME, A. L.; Characterization of protein glycosylation by mass spectrometry. **Current Opinion in Biotechnology**, v, 7, n. 1, p. 4-10, 1996.

BURTON, K.A.; KABIGTING, E. B.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in the hypothalamic somatostatin neurons. **Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 958-63, 1992.

CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C. Interaction between body composition, leptin and growth hormone status. **Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 297-314, 1998.

CATTINI, P. A.; BOCK, M. E.; JIN, Y.; ZANGHI, J. A.; VAKILI, H. A useful model to compare human and mouse growth hormone gene chromosomal structure, expression and regulation, and immune tolerance of human growth hormone analogues. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 42-43, p. 58-65, 2018.

CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; LIMA, E. R.; VIEIRA, D. P.; SQUAIR, P. L.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P. Efficient Non-invasive plasmid-DNA administration into tibialis cranialis muscle of "Little" mice. **Current Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, p. 230-235, 2017.

CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, N. A. J.; LIMA, E. R.; JAKOBSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; GISSEL, H.; AAGAARD, L.; JENSEN, T. G.; JORGE, A. A.

L.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. A novel homologous model for gene therapy of dwarfism by non-viral transfer of the mouse growth hormone gene into immunocompetent dwarf mice. **Current Gene Therapy**, v. 14, n. 1, p. 44-51, 2014.

CHANSON, P.; SALENAVE, S. Acromegaly. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 3, p. 17, 2008.

CHARD, T. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. In: BURDON, R. H.; KNIPPENBERG, P. H.; CHARD, T. (Ed.) **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, 4th ed. Elsevier, p. 291-534, 1990.

CHEN, W. Y.; WIGHT, D. C.; WAGNER, T. E.; KOPCHICK, J. J. Expression of mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, n. 13, p. 5061-5, 1990.

CHEN, W. Y.; WIGHT, D. C.; MEHTA, B. V.; WAGNER, T. E.; KOPCHICK, J. J. Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 12, p. 1845-52, 1991.

CHU, Q.; ZHAO, X.; CHEN, J.; XU, T. The evolution and function characterization of suppressor of cytokine signaling 1b (SOCS1b) in miiuy croaker. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 97, p. 146-152, 2020.

CUNNINGHAM, B. C.; WELLS, J. A. High-resolution epitope mapping of hGH – receptor interactions by alanine – scanning mutagenesis. **Science**, v. 244, n. 4908, p. 1081-5, 1989.

CUNNINGHAM, B. C.; ULTSCH, M.; VOS, A. M. D.; MULKERRIN, M. G.; CLAUSER, K. R.; WELLS, J. A. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. **Science**, v. 254, n. 5033, p. 821-5, 1991.

DAMIANI, R.; ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA, J. E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1658-72, 2013.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 2015.

DE VOS, A. M.; ULTSCH, M.; KOSSIAKOFF, A. A. Human growth hormone and extracellular domains of its receptor: crystal structure of the complex. **Science**, v. 255, n. 5042, p. 306-12, 1992.

DEHKHODA, F.; LEE, C. M. M.; MEDINA, J.; BROOKS, A. J. The growth hormone receptor: Mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 35, 2018.

DEVESA, J.; DEVESA, P.; REIMUNDE, P. Hormona de crecimiento: acciones y aplicaciones preventivas y terapéuticas Growth hormone revisited. **Medicina Clínica** (Barc), v. 135, n. 14, p. 665 – 670, 2010.

DEVESA, J.; ALMWINGLÓ, C & DEVES, P. Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth? Clinical medicine insights. **Endocrinology and diabetes**, v. 9, p. 47–71, 2016.

DEVESA, J. The Complex World of Regulation of Pituitary Growth Hormone Secretion: The Role of Ghrelin, Klotho, and Nesfatins in It. **Front. Endocrinology**. Acesso em 01 de junho de 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7991839/>. Última atualização 11 de março de 2021.

DONATO, J Jr.; WASINSKI, F.; FURIGO, IC.; METZGER, M.; FRAZAO, R. Central Regulation of Metabolism by Growth Hormone. **Cells**, v. 11, n. 1, p. 129, 2021.

FATTORI, E.; CAPPELLETTI, M.; ZAMPAGLIONE, I.; MENNUNI, C.; CALVARUSO, F.; ARCURI, M.; RIZZUTO, G.; COSTA, P.; PERRETTA, G.; CILIBERTO, G.; MONICA, N. L. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. **The Journal of Gene Medicine**, v. 7, n. 2, p. 228-36, 2005.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; GUERRA, B.; DÍAZ-CHICO, JC & FLORES-MORALES, A. Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 66, 2013.

FRADKIN, H, A.; BOAND, S. C; EISENBERG, S. P.; ROSENDAHL, M. S.; RANDOLPH, T. W. Recombinant Murine Growth Hormone from E. coli Inclusion Bodies: Expression, High-Pressure Solubilization and Refolding, and Characterization of Activity and Structure. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 743-749, 2010.

FRADKIN, H, A.; CARPENTER, F, J.; RANDOLPH, T, W. Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models. **Journal of Pharmacology Science**, v. 98, p. 3247–3264, 2009.

FISKER, S. Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: methodological and clinical aspects. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 16, n. 1, p. 1-28, 2006.

FLIEDL, L.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R. Human cell line for the production of recombinant proteins: on the horizon. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 673-9, 2015.

FURIGO, I. C.; METZGER, M.; TEIXEIRA, P. D. S.; SOARES, C. R. J.; DONATO, J. Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, p. 222 – 341, 2017.

FURIGO, I. C.; TEIXEIRA, P. D. S.; SOUZA, G. O.; COUTO, G. C. L.; ROMERO, G. G.; PERELLÓ, M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, L. L.; METZGER, M.; LIST, E. O.; KOPCHICK, J. J.; DONATO, J.J.R. Growth hormone regulates neuroendocrine responses to weight loss via AgRP neurons. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 662, 2019.

GAHETE, MD.; CORDOBA-CHACON J.; ANADUMAKA CV.; LIN Q.; BRUNING JC.; KAHN CR.; LUQUE RM & KINEMAN, RD. Elevated GH/IGF-I, due to somatotrope- 89 specific loss of both IGF-I and insulin receptors, alters glucose homeostasis and insulin sensitivity in a diet-dependent manner. **Endocrinology**, v. 152, p. 4825-483, 2011.

GEBER, S.; SAMPAIO, M. Avaliação dos efeitos do estradiol e do FSH nos níveis de leptina em mulheres com supressão da função hipofisária. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 4, p. 216-221, 2005.

GEISSE, S.; VOEDISCH, B. Transient expression technologies: past, present, and future. **Methods in Molecular Biology**, v. 899, p. 203-19, 2012.

GHOSH, A.; GAO, L.; THAKUR, A.; SIU, P. M.; LAI, C. W. K. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 50, 2017.

GISABELLA, B.; FARAH, S.; PENG, X.; BURGOS-ROBLES, A.; LIM, S. H.; GOOSENS, K. A. Growth hormones biases amygdala network activation after fear learning. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 11, p. e960, 2016.

GOFFIN, V.; KELLY, P. A. Prolactin and growth hormone receptors. **Clinical Endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 247-55, 1996.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H. & ARMSTRONG, A. W. Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da Farmacoterapia. **Guanabara Koogan**. 2ªed. [S. l.], v. 103, p. 914, 2010.

GOLZIO, M.; ROLS, M. P.; TEISSIÉ, J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. **Methods**, v. 33, n. 2, p. 126-35, 2004.

GOODMAN, H. M.; LEVY, L. K. Preparation and biological reactivity of polyiodinated human growth hormone. **Endocrinology**, v. 113, n. 6, p. 2017-23, 1983.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **The Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59-74, 1977.

GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **The Biochemical Journal**, v. 89, n. 1, p. 114-23, 1963.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. **Tratado de fisiologia médica**. 12ªed.: Elsevier, Cap.75, p. 941-953, 2011.

HAINAN, L.; HUILIN, L.; KHAN, M. A.; XIN, Z.; YUJIANG, Y.; HUI, Z.; NAIQUAN, Y. The basic route of the nuclear translocation porcine growth hormone (GH) – growth hormone receptor (GHR) complex (pGH/GHR) in porcine hepatocytes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 266, p. 101-109, 2018.

HAI-NAN, L.; HUI-LIN, L.; ZI-QI, Z.; GAN, L.; XUE-QI, F.; XIN, Z. Cellular internalization and trafficking of 20 KDa human growth hormone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 270, p. 82-89, 2019.

HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 3, p. 336-46, 1999.

HARA, K.; HSU CHEN, C. J.; SONENBERG, M. Recombination of the biologically active peptides from a tryptic digest of bovine growth hormone. **Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 550-6, 1978.

HARADA, R.; MORITO, T.; YANAI, K. Radiolabeled proteins for the development of biopharmaceuticals. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 155, n. 3, p. 159-163, 2020.

HELANDER, H.; CLARK, R. G.; MODE, A. Effects of rGH and G118RrGH on the induction of CYP2C12 and IGF-1 in primary rat hepatocytes. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 13, n. 5, p. 287-94, 2003.

HELLER, S. R.; RODRIGUES GOULART, H.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. **Journal of Biotechnology**, v. 145, p. 334-40, 2010.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Interpretation of cytochrome signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. **Genes & Development**, v. 22, n. 6, p. 711-21, 2008.

HERMAN, A. M.; ORTIZ-GUZMAN, J.; KOCHUKOV, M.; HERMAN, I.; QUAST, K. B.; PATEL, J. M.; TEPE, B.; CARLSON, J. C.; UNG, K.; SELEVER, J.; TONG, Q.; ARENKIEL, B. R. A cholinergic basal forebrain feeding circuit modulates appetite suppression. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 253-256, 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. **Current Gene Therapy**, v. 12, p. 437-443, 2012.

HU, J.; HAN, J.; LI, H.; ZHANG, X.; LIU, L. L.; CHEN, F.; ZENG, B. Human embryonic kidney 293 cells: A vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. **Cells, Tissues, Organs**, v. 205, n. 1, p. 1-8, 2018.

HUGHES, J. P.; TANAKA, T.; GOUT, P. W.; BEER, C. T.; NOBLE, R. L.; FRIESEN, H. G. Effect of iodination on human growth hormone and prolactin: characterized by bioassay, radioimmunoassay, radioreceptor assay, and electrophoresis. **Endocrinology**, v. 111, n. 3, p. 827-32, 1982.

JAIN, N. K.; BARKOWSKI-CLARK, S.; ALTMAN, R.; JOHNSON, K.; SUN, F.; ZMUDA, J.; LIU, C. Y.; KITA, A.; SCHULZ, R.; NEILL, A.; BALLINGER, R.; PATEL, R.; LIU, J.; MPANDA, A.; HUTA, B.; CHIOU, H.; VOEGTLI, W.; PANAVAS, T. A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. **Protein Expression and Purification**, v. 134, p. 38-46, 2017.

JESUS, G. P. P. Avaliação do efeito da terapia gênica por eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento murino em modelo animal de osteogênese imperfeita (Tese). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 2020.

JONES J. I.; CLEMMONS D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995.

JUÁREZ-AGUILAR, E.; OLIVARES-HERNÁNDEZ, J. D.; REGALADO-SANTIAGO, C.; GARCÍA-GARCÍA, F. The role of growth hormone in hippocampal function. **Vitamins and Hormones**, v. 118, p. 289-313, 2022.

KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; PU, S.; XU, B.; HORVANTH, T.L.; KALRA, P.S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews**, v. 20, p. 68-100, 1999.

KASTRUP, Y.; GREVÈS, M. LE.; NYBERG, F.; BLOMQUIST, A. Distribution of growth hormone receptor mRNA in the brain stem and spinal cord of the rat. **Neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 419-25, 2005.

KERKHOF, P. V.; SACHSE, M.; KLUMPERMAN, J.; STROUS, G. J. Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment to clathrin-coated membrane domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3778-84, 2001.

KOPCHICK, J. J.; PARKINSON, C.; STEVENS, E. C.; TRAINER, P. J. Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 623-46, 2002.

KOPCHICK, J. J., LIST, O. E., KELDER, B., GOSNEU, S. E., BERRYMAN, E. D. Evaluation of growth hormone (GH) action in mice: discovery of GH receptor antagonists and clinical indications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 386, p. 34-45, 2014.

KROHN, K.; SHERMAN, L.; WELCH, M. Studies of radioiodinated fibrinogen. I. Physicochemical properties of the ICI, chloramine- T, and electrolytic reaction products. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 285, n. 2, p. 404-13, 1972.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1989.

LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 651-62, 2002.

LI, C. H.; DIXON, J. S.; LIU, W. K. Human pituitary growth hormone. XIX. The primary structure of the hormone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 133, n. 1, p. 70-91, 1969.

LIMA, E. R.; CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; de JESUS, G. P. P.; GOMES, A. M.; ZACARIAS, E. A.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. Optimization of mouse growth hormone plasmid DNA electrotransfer into tibialis cranialis muscle of "little" mice. **Molecules**, v. 25, p. 1-9, 2020.

LIMA, E. R.; FREIRE, R. P.; SUZUKI, M. F.; OLIVEIRA, J. E.; YOSIDAKI, V. L.; PERONI, C. N.; SEVILHANO, T.; ZORZETO, M.; TORATI, L. S.; SOARES, C. R. J.; LIMA, I. D. M.; KRONENBERGER, T.; MALTAROLLO, V. G.; BARTOLINI, P. Isolation and characterization of the Arapaima gigas growth hormone (ag-GH) cDNA and Three-dimensional modeling of this hormone in comparison with human hormone (hGH). **Biomolecules**, v. 13, n. 1, p. 158, 2023.

LINCOLN, D. T.; EL-HIFNAWI, E.; SINOWATZ, F.; WATERS, M. J.; Immunohistochemical localization of growth hormone receptor binding protein in the mammalian cerebellum. **Annals of Anatomy**, v. 176, n. 5, p. 419-27, 1994.

LINOSSI, E. M.; BABON, J. J.; HILTON, D. J.; NICHOLSON, S. E. Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 3, p. 241-8, 2013.

LOBIE, P. E.; MERTANI, H.; MOREL, G.; MORALES-BUSTOS, O.; NORSTEDT, G.; WATERS, M. J. Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 21330-9, 1994.

LOBIE, P. E.; SADIR, R.; GRAICHEN, R.; MERTANI, H. C.; MOREL, G. Caveolar internalization of growth hormone. **Experimental Cell Research**, v. 246, n. 1, p. 47-55, 1999.

MACCARIO, M.; PROCOPIO, M.; LOCHE, S.; CAPPÀ, M.; MARTINA, V.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Interaction of free fatty acids and arginine on growth hormone secretion in man. **Metabolism**, v. 43, n. 2, p. 223-6, 1994.

MALAJOVICH, M. A. M. Biotecnologia. **A Engenharia da genética** 2ed. - Cap. 9 – p. 95-113, 2016.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 255-61, 2003.

MATTERA, R.; DELLACHA, J. M. Biological and immunological characterization of iodinated bovine growth hormone. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 19, n. 2, p. 181-6, 1982.

MEISTER, B.; GÖMÜÇ, B.; SUAREZ, E.; ISHII, Y.; DÜRR, K.; GILLBERG, L. Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. **The European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 2731-40, 2006.

MENDONÇA, F.; OLIVEIRA, J. E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotrophin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **Journal of Chromatography**, v. 1062, n. 1, p. 103-12, 2005.

MENEZES, A. C. S. C.; SUZUKI, M. F.; OLIVEIRA, J. E.; RIBELA, M. T. C. P.; FURIGO, I. C.; DONATO, J.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. J. Expression, purification, and characterization of the authentic form of human growth hormone receptor antagonist G120R-hGH obtained in *Escherichia coli* periplasmic space. **Protein Expression and Purification**, v. 131, p. 91-100, 2017.

MENEZES, F. Importância do receptor do hormônio de crescimento no transporte de GH para o sistema nervoso central (Dissertação). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 2023.

MEYER, R. M.; BURGOS-ROBLES, A.; LIU, E.; CORREIA, S. S.; GOOSENS, K. A. A ghrelin- growth hormone axis drives stress-induced vulnerability to enhanced fear. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 12, p. 1284-94, 2014.

MODE, A.; TOLLET, P.; WELLS, T.; CARMIGNAC, D. F.; CLARK, R. G.; CHEN, W. Y.; KOPCHICK, J. J.; ROBINSON, I. C. The human growth hormone (hGH) antagonist G120RhGH does not antagonize GH in the rat, but has paradoxical agonist activity, probably via the prolactin receptor. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 447-54, 1996.

MOLLER, N & JORGENSEN, J.O. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 2, p. 152–177, 2009.

MORGANTI, L.; SOARES, C. R.; AFFONSO, R.; GOUT, P. W.; BARTOLINI, P. Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27 (Pt 1), p. 63-70, 1998.

MUSOLINO, N. R. C. Tumores hipofisários: opções terapêuticas atuais e perspectivas futuras de tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 4, p. 482-491, 2003.

NEEL, B. G.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 193-204, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed Editora**, 7 ed., 2018.

NYBERG, F. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functions significance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 330-48, 2000.

NICHOLLS, A. R.; HOLT, R. I. G. Growth hormone and Insulin-Like Growth Factor-1. **Frontiers of Hormone Research**, v. 47, p. 101-14, 2016.

OKADA, S.; CHEN, W. Y.; WIEHL, P.; KELDER, B.; GOODMAN, H. M.; GULLER, S.; SONENBERG, M.; KOPCHICK, J. J. A growth hormone (GH) analog can antagonize the ability of native GH to promote differentiation of 3T3-F442A preadipocytes and stimulate insulin-like and lipolytic activities in primary rat adipocytes. **Endocrinology**, v. 130, n. 4, p. 2284-90, 1992.

OLARESCU, N.C.; GUNAWARDANE, K.; HANSEN, T.K.; MOLLER, N.; JORGENSEN, J.O.L. Normal physiology of growth hormone in adults. **Endotext. Acesso em 17 de maio de 2023**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279056/>. Última atualização 16 de outubro de 2019.

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. **The Journal of Gene Medicine**, v. 12, n. 7, p. 580-5, 2010.

OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; VORAUER-UHL, K.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. **Molecular Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 159-66, 2008.

OLIVEIRA, J. E.; MENDONÇA, F.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Determination of Chinese hamster ovary cell- derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 787, n. 2, p. 345-55, 2003.

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

PACZOSKA-ELIASIEWICZ, H. E.; SALOMON, G.; REICHER, S.; GUSSAKOWSKY, E. E.; HRABIA, A.; GERTLER, A. Preparation and characterization of recombinant

chicken growth hormone (chGH) and its putative antagonist chGH G119R mutein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1091, p. 501-8, 2006.

PARKINSON, C.; TRAINER, P. J. Pegvisomant: a growth hormone receptor antagonist for the treatment of acromegaly. **Growth hormone & IGF Research**, p. S119-23, 2000.

PATEL, R.; PAGE, S.; AL-AHMAD, A. J. Isogenic blood-brain barrier models based on patient-derived stem cells display inter-individual differences in cell maturation and functionality. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 1, p. 74-88, 2017.

PERONI, C. N.; HAYASHIDA, C. Y.; NASCIMENTO, N.; LONGUINI, V. C.; TOLEDO, R. A.; BARTOLINI, P.; BOWERS, C. Y.; TOLEDO, S. P. A. Growth hormone response to growth hormone – releasing peptide-2 in growth hormone – deficient little mice. **Clinics**, v. 67, n. 3, p. 265-72, 2012.

PERONI, C. N.; SOARES, C. R.; GIMBO, E.; MORGANTI, L.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.35, n. 1, p. 19-26, 2002.

PERRET-VIVANCOS, C.; ABBATE, A.; ARDAIL, D.; RACCURT, M.; USSON, Y.; LOBIE, P. E.; MOREL, G. Growth hormone activity in mitochondria depends on GH receptor Box 1 and involves caveolar pathway targeting. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 3, p. 215-32, 2006.

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. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 5, p. 854-860, 2008.

POSTEL-VINAY, M. C. Growth hormone-binding protein: biological significance. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 417, p. 98-101, 1996.

QUARESMA, P. G. F.; TEIXEIRA, P. D. S.; WASINSKI, F.; CAMPOS, A. M. P.; LIST, E. O.; KOPCHICK, J. J.; DONATO, J.J.R. Cholinergic neurons in the hypothalamus and dorsal motor nucleus of the vagus are directly responsive to growth hormone. **Life Sciences**, v. 259, p. 118229, 2020.

QIU, H.; YANG, J.K.; CHEN, C. Influence of insulin on growth hormone secretion, level and growth hormone signalling. **Acta Physiologica Sinica**, v. 69, n. 5, p. 541–556, 2017.

RIBELA, M. T. C., MURATA, Y., MORGANTI, L., TONIOLO, D., & BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **Journal of immunological methods**, v. 159, n. 1-2, p. 269-74, 1993.

RIBELA, M. T., GOUT, P. W. & BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. **Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 790, p. 285-316, 2003.

RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. **Journal Biological Chemistry**, v. 253, n. 8, p. 2769–2776, 1978.

ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n.1, p. 6-13, 1997.

ROTH, J.; GLICK, SM.; YALOW, RS & BERSONSA. Hypoglycemia: a potente stimulus to secretion of growth hormone. **Science**, v.140, p. 987 – 998, 1963.

ROTWEIN, P. Regulation of gene expression by growth hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 507, p. 110788, 2020.

SANT'ANA, P. M.; OLIVEIRA, J. E.; LIMA, E. R.; SOARES, C. R. J.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Human thyroid-stimulating hormone synthesis in human embryonic kidney cells and related N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition determination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1215-1228, 2018.

SCHERRMANN, J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 6, p. 349-54, 2002.

SEVILHANO, T.; CARVALHO, R. F.; OLIVEIRA, N. A. J.; OLIVEIRA, J. E.; MALTAROLLO, V. G.; TROSSINI, G.; GARCEZ, R.; BARTOLINI, P. Molecular cloning and characterization of pirarucu (*Arapaima gigas*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β - subunit cDNAs. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0183545, 2017.

SHARP, S. B.; PIERCE, J. G. Doubly radioiodinated luteinizing hormone: preparation and characterization. **Endocrinology**, v. 109, n. 4, p. 1052-60, 1981.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 907-921, 2018.

SILVA, F. D.; OLIVEIRA, J. E.; FREIRE, R. P.; SUZUKI, M. F.; SOARES, C. R.; BARTOLINI, P. Expression of glycosylated human prolactin in HEK293 cells and related N-glycan composition analysis. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 135, 2019.

SILVA, T. M.; WASINSKI, F.; FLOR, K. C.; LIST, E. O.; KOPCHICK, J. J.; TAKAKURA, A. C.; DONATO, J. J.; MOREIRA, T. S. The effect of central growth hormone action on hypoxia ventilatory response in conscious mice. **Brain Research**, v. 1791, p. 147995, 2022.

SOARES, C. R.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J. H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. ***Biotechnology and Applied Biochemistry***, v. 32 (Pt 2), p. 127-135, 2000.

SOARES, C. R.; GLEZER, A.; OKAZAKI, K.; UEDA, E. K.; HELLER, S. R.; WALKER, A. M.; GOFFIN, V.; BARTOLINI, P. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. ***Protein Expression and Purification***, v. 48, p. 182-194, 2006.

SOARES, D. V.; CONCEIÇÃO, F. L.; VAISMAN, M. Clinical, laboratory and therapeutics aspects of Sheehan's syndrome. ***Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia***, v. 52, p. 872-878, 2008.

SOUZA, S. C.; FRICK, G. P.; WANG, X.; KOPCHICK, J. J.; LOBO, R. B.; GOODMAN, H. M. A single arginine residue determines species specificity of the human growth hormone receptor. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA***, v. 92, n. 4, p. 959-63, 1995.

STEYN, F.J.; TOLLE, V.; Chen, C & EPELBAUM, J. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. ***Comprehensive Physiology***, v. 6, n .2, p. 687–735, 2016.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. ***Protein Expression and Purification***, v. 84, n. 1, p. 147-53, 2012.

UEDA, E. K.; SOARES, C. R.; BARTOLINI, P.; DEGUZMAN, A.; LORENSON, M. Y.; WALKER, A. M. A molecular mimic of phosphorylated prolactin (S179D PRL) secreted by eukaryotic cells has a conformation with an increased positive surface charge compared to that of unmodified prolactin. ***Biochemistry***, v. 48, p. 6887-6897, 2009.

VAIDYANATHAN, G.; ZALUTSKY, M. R. The radiopharmaceutical chemistry of the radioisotopes of iodine. ***Radiopharmaceutical Chemistry***, v. 978, n. 3, p. 122, 2019.

VENTINI, D. C., DAMIANI, R., SOUSA, A. P., DE OLIVEIRA, J. E., PERONI, C. N., RIBELA, M. T., BARTOLINI, P., TONSO, A., SOARES, C. R. & PEREIRA, C. A. Improved bioprocess with CHO-hTSH cells on higher microcarrier concentration provides higher overall biomass and productivity for rhTSH. ***Applied Biochemistry Biotechnology***, v. 164, p. 401-9, 2011.

VIJAYAKUMARi, A.; YAKAR, S & LEROITH, D. The intricate role of growth hormone in metabolism. ***Frontiers in endocrinology***, v. 2, p. 32, 2011.

XU, B. C.; CHEN, W. Y.; GU, T.; RIDGWAY, D.; WIEHL, P.; OKADA, S.; KOPCHICK, J. J. Effects of growth hormone antagonists on 3T3-F442A preadipocyte differentiation. ***The Journal of Endocrinology***, v. 146, n. 1, p. 131-9, 1995.

XU, Y.; FISHER, G. J. Receptor type protein tyrosine phosphatases (RPTPs) – roles in signal transduction and human disease. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 6, n. 3, p. 125-38, 2012.

WALLIS, M. Growth hormone: deletions in the protein and introns in the gene. **Nature**, v. 284, p. 512, 1980.

WASINSKI, F.; PEDROSO, J. A. B.; SANTOS, W. O. D.; FURIGO, I. C.; GARCIA-GALIANO, D.; ELIAS, C. F.; LIST, E. O.; KOPCHICK, J. J.; SZAWKA, R. E.; DONATO, J. J. Tyrosine hydroxylase neurons regulate growth hormone secretion via short-loop negative feedback. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 22, p. 4309-4322, 2020.

WATERS, M. J.; BROOKS, A. J. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. **The Biochemical Journal**, v. 466, n. 1, p. 1-11, 2015.

WELLS, J. A. Binding in the growth hormone receptor complex. **Proc. of the National Academy of the USA**, v. 93, n. 1, p. 1-6, 1996.

WELLS, J. A.; CUNNINGHAM, B. C.; FUH, G.; LOWMAN, H. B.; BASS, S. H.; MULKRRIN, M. G.; ULTSCH, M.; VOS, A. M. The molecular basis for growth hormone – receptor interactions. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 48, p. 253-75, 1993.

WELSH, C. L.; PANDEY, P.; AHUJA, L. G. Protein Tyrosine Phosphatases: A new paradigm in an old signaling system? **Advances in Cancer Research**, v. 152, p. 263-303, 2021.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 26, n.2, p. 19–39, 2005.

WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. **The Biochemical Journal**, v. 428, n. 2, p. 133-45, 2010.

WU, S.; LIU, K.; CHENG, W.; SU, S.; LIN, Y.; LIN, T.; CHENG, Y.; CHANG, J.; WU, Y.; LIU, C. Growth hormone rescue cerebellar degeneration in SCA3 transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 529, n. 2, p. 467-473, 2020.

YAKAR, S., LIU, J.L., STANNARD, B., BUTLER, A., ACCILI, D., SAUER, B., LEROITH, D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7324–7329, 1999.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 7, p. 1157-75, 1960.

YAMADA, A.; TRABOULSI, A.; DITTERT, L. W.; HUSSAIN, A. A. Chloramine-T in radiolabeling techniques. III. Radioiodination of biomolecules containing thioether groups. **Analytical Biochemistry**, v. 277, n. 2, p. 232-5, 2000.

ZHANG, P.; TAN, D. L.; HENG, D.; WANG, T.; MARIATI; YANG, Y.; SONG, Z. A functional analysis of N-glycosylation- related genes on sialylation of recombinant erythropoietin in six commonly used mammalian cell lines. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 6, p. 526-36, 2010.

ZHANG, Y.; CHUA JR, S. Leptin Function and Regulation. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 1, p. 351-369, 2017.

ZHONG, C.; SONG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, T.; DUAN, M.; LI, Y.; LIAO, L.; ZHU, Z.; HU, W. Increased food intake in growth hormone-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) may be mediated by upregulating Agouti-related protein (AgRP). **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p. 81-8, 2013.

ZHONG, X.; MA, W.; MEADE, C. L.; TAM, A. S.; LLEWELLYN, E.; CORNELL, R.; COTE, K.; SCARCELLI, J. J.; MARSHALL, J. K.; TZVETKOVA, B.; FIGUEROA, B.; DININO, D.; SIEVERS, A.; LEE, C.; GUO, J.; MAHAN, E.; FRANCIS, C.; LAM, K.; D'ANTONA, A. M.; ZOLLNER, R.; ZHU, H. L.; KRIZ, R.; SOMERS, W.; LIN, L. Transient CHO expression platform for robust antibody production and its enhanced N-glycan sialylation on therapeutic glycoproteins. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. e2724, 2019.

ZHOU, W.; BIBILA, T.; GLAZOMITSKY, K.; MONTALYO, J.; CHAN, C.; DISTEFANO, D.; MUNSHI, S.; ROBINSON, D.; BUCKLAND, B.; AUNINS, J. Large scale production of recombinant mouse and rat growth hormone by fed-batch GS-NSO cells cultures. **Cytotechnology**, v. 22, n. 1-3, p. 239-50, 1996.

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

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