

ELEOTRANSFERÊNCIA DE DIFERENTES PLASMÍDEOS CONTENDO O GENE DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO EM CAMUNDONGOS ANÕES IMUNODEFICIENTES

Maurício Jensen e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Em nosso laboratório foi desenvolvido um modelo de terapia gênica *ex vivo*, utilizando queratinócitos humanos transduzidos com vetores retrovirais contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) e de camundongo (mGH) [1,2]. Quando estas células foram implantadas em camundongos anões imunodeficientes (lit/scid), foram obtidos níveis circulantes relativamente altos destes hormônios, porém os mesmos não se mantiveram por períodos prolongados. Uma alternativa é a administração *in vivo* de vetores não virais (*naked DNA*), os quais são potencialmente mais seguros e baratos, porém menos eficientes que os vetores virais. A eletrotransferência é uma das técnicas utilizadas para aumentar a eficiência desta administração [3,4].

OBJETIVO

Utilizar a administração de diferentes vetores não virais associada à eletrotransferência para aumentar a eficiência da expressão *in vivo* do hGH em camundongos lit/scid.

METODOLOGIA

Foram utilizados os seguintes plasmídeos: o vetor pUC-UBI-hGH, que contém o promotor da ubiquitina C e a sequência genômica do hGH e foi gentilmente cedido pelo Dr. Thomas G. Jensen (Universidade de Aarhus, Dinamarca); e o vetor comercial pCDNA 3.1 (+/-) que possui o promotor do citomegalovírus (CMV), no qual foram inseridas a sequência genômica do hGH (pCDNA-hGH gDNA) ou a sequência

complementar (pCDNA-hGH cDNA). Os plasmídeos ou solução salina (controle) foram injetados via intramuscular em camundongos lit/scid e seguiu-se a eletroporação nas seguintes condições: 8 pulsos de 50 V e 20 ms com intervalos de 0,5 s. Após diferentes tempos, o sangue dos animais foi coletado via cavidade retro-orbital e os níveis de hGH no soro foram determinados por radioimunoensaio (RIA). No caso do vetor pUC-UBI-hGH, foi também determinado o ganho de peso dos animais, de acordo com bioensaio padronizado em nosso laboratório [1,2,5].

RESULTADOS

Foram obtidos níveis circulantes de hGH em camundongos lit/scid entre 1,5 e 3,0 ng/ml, após a administração de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-hGH. Estes níveis persistiram por até 60 dias e proporcionaram um aumento de peso significativo dos camundongos de 33,1% comparado a uma perda de 4,2% no grupo controle (injeção de solução salina).

Quanto aos experimentos utilizando os plasmídeos contendo as diferentes sequências do gene do hGH, foram obtidos os seguintes níveis circulantes de hGH: 0,9 ng/ml (dia 1) e 1,5 ng/ml (dia 3) para o hGH gDNA, enquanto que para o hGH cDNA, os níveis foram de 3,6 ng/ml (dia 1) e 4,0 ng/ml (dia 3). Portanto, a utilização da construção contendo o cDNA demonstrou ser aparentemente mais eficiente, possivelmente por serem necessárias menos etapas de processamento, o que facilitaria sua secreção pelas células-alvo (fibras musculares). Outra possibilidade seria que o plasmídeo menor,

ou seja aquele que possui a sequência do cDNA do hGH (850 pb), teria a probabilidade de penetrar mais facilmente pelos poros abertos transientemente na membrana celular durante a eletroporação, quando comparado com o plasmídeo maior, que contém o gDNA do hGH (2152 pb).

CONCLUSÕES

Em conclusão, foram obtidos níveis sustentáveis e prolongados de hGH na circulação de camundongos lit/scid, que também apresentaram um aumento de peso significativo, após administração direta de um plasmídeo não viral contendo o gene deste hormônio. Foi também demonstrado que a escolha da construção gênica é um fator importante para o aumento do desempenho desta estratégia de terapia gênica *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bellini, MH, Peroni, CN and Bartolini P. Increases in weight of growth hormone-deficient and immunodeficient (lit/scid) dwarf mice after grafting of hGH-secreting, primary human keratinocytes. *FASEB J* **17**: 2322-2324, 2003.
- [2] Peroni, CN, Cecchi, CR, Rosauero, CW, Nonogaki, S, Boccardo, E and Bartolini P. Secretion of mouse growth hormone by transduced primary human keratinocytes: prospects for an animal model of cutaneous gene therapy. *J Gene Med* **10**:734-743, 2008.
- [3] Ratanamart, J and Shaw, JA. Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy for circulating therapeutic protein replacement: a tale of the tortoise and the hare? *Curr Gene Ther* **6**: 93-110, 2006.
- [4] Prud'homme, GJ, Draglia-Akli, R and Wang, Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. *Gene Ther* **14**: 553-564, 2007.
- [5] Bellini, MH and Bartolini, P. *In vivo* bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf "little" mice. *Endocrinology* **132**: 2051-2055, 1993.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq e FAPESP