

Estudo da correção fenotípica do nanismo após eletrotransferência do gene do hormônio de crescimento humano em camundongos anões imunodeficientes

Mayara Ledier de Azevedo e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A terapia gênica consiste na introdução de genes funcionais em células específicas de um indivíduo ou animal. Esta transferência de material genético visa a reposição de um gene defeituoso/ausente ou a introdução de novas funções na célula [1]. Para aumentar a eficiência dessa metodologia *in vivo*, a injeção direta de DNA plasmidial pode ser utilizada em conjunto com a eletrotransferência.

OBJETIVO

O objetivo principal é a realização de estudos que nos levem em direção à máxima correção fenotípica possível do nanismo, utilizando camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*), tratados com o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) e a técnica da eletrotransferência.

METODOLOGIA

Camundongos anões imunodeficientes da linhagem CB17-Ghrhr *lit/+ Prkdc scid/Bm (lit/scid)*, foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina, via intraperitoneal. Os pêlos da região do músculo quadríceps e tibial anterior foram raspados. O músculo quadríceps foi exposto para receber a injeção com a enzima hialuronidase (20 U/50 μ L) e para o tibial anterior não exposto houve uma alteração do volume final desta enzima (20 U/20 μ L). Após 30 minutos, foram injetados 50 μ g do plasmídeo pUC-UBI-hGH, que possui o gene do hGH, em um volume de 20 μ L/animal. Em seguida, foi realizada a eletroporação nestes músculos, utilizando os parâmetros já padronizados anteriormente: 8 pulsos de 20 ms e 0,5 s de intervalo e 90 V/cm [2] ou uma combinação de um pulso alto e curto (800

V/cm e 100 μ s) e um pulso baixo e longo (100 V/cm e 400 ms), que denominamos HV/LV. Solução salina foi administrada, como controle, em um volume de 20 μ L/animal. Para todos os experimentos foram alterados os volumes de todas as administrações, onde o volume de hialuronidase, da solução para diluição do pUC-UBI-hGH e da solução salina do grupo controle passou de 50 μ l para 20 μ l/animal, uma vez que foi observado que o volume anterior era um pouco grande em relação ao tamanho do músculo destes camundongos anões. O sangue dos animais foi coletado para dosagem de hGH por radioimunoensaio e o peso dos mesmos foi monitorado utilizando balança digital, durante um ensaio de 60 dias, assim como as medidas iniciais e finais do comprimento total do corpo (da ponta do nariz ao final da cauda), da cauda e dos fêmures direito e esquerdo, com paquímetro digital.

RESULTADOS

Foi realizado um experimento utilizando os músculos quadríceps e tibial anterior com o principal objetivo de observar se a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH, sem a exposição prévia do músculo, seria capaz de expressar o hGH na circulação de camundongos *lit/scid*. Após 3 dias da administração, foi coletado o sangue para determinação de hGH no soro destes animais. Como pode ser observado na Figura 1, os grupos que apresentaram os maiores níveis deste hormônio foram tratados no músculo quadríceps com exposição ($5,03 \pm 2,15$ ng hGH/mL), ou no músculo tibial anterior sem exposição ($3,45 \pm 0,91$ ng hGH/mL), seguidos de eletrotransferência de alta e baixa voltagem (HV/LV).

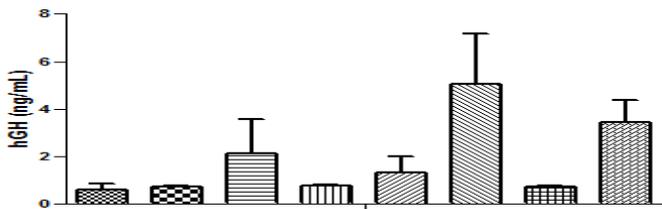


Figura 1: Níveis de hGH no soro de camundongos *lit/scid* após a administração do plasmídeo pUC-UBI-hGH ou de salina, seguida de diferentes protocolos de eletrotransferência; salina, sem exposição do músculo quadríceps, seguida de eletrotransferência com 90 V/cm (▨); salina, com exposição do músculo quadríceps, seguida de eletrotransferência HV/LV (▩); pUC-UBI-hGH, no músculo quadríceps com (▧) e sem exposição (▨), seguida de eletrotransferência com 90 V/cm; pUC-UBI-hGH, no músculo quadríceps sem (▧) e com (▩) exposição, seguida de eletrotransferência HV/LV; pUC-UBI-hGH, no músculo quadríceps exposto, seguida de eletrotransferência com 90V/cm, (▩); pUC-UBI-hGH, no músculo tibial anterior sem exposição, seguida de eletrotransferência HV/LV (▩).

Com base nos resultados do experimento anterior, foi realizada uma administração do DNA plasmidial nos músculos tibial anterior direito e esquerdo. Após 30 dias, a variação de peso corpóreo do grupo tratado de 40 dias, em relação ao dia inicial ao tratamento foi de 3,64 g, um valor muito superior ao do grupo de 80 dias que foi de 2,07 g e do grupo controle, de -0,01 g/camundongo/dia. Após ter sido observada uma estabilização na variação de peso corpóreo dos grupos tratados, foi realizada uma segunda administração (dia 41) utilizando os mesmos parâmetros da primeira cirurgia. No final do tratamento de 60 dias, a inclinação da curva de variação de peso do grupo de camundongos jovens tratados de 40 dias (0,083 g/camundongo/dia) foi o dobro da do grupo tratado de 80 dias (0,040 g/camundongo/dia) e ambas foram bem superiores em relação a do grupo controle (0,001 g/camundongo/dia). Para os camundongos de 40 dias foi obtido um aumento de peso corpóreo de 84%, em relação aos valores iniciais.

Todos os parâmetros de crescimento foram superiores para o grupo de camundongos de 40 dias em relação aos de 80 dias e controle

(salina), indicando a importância de realização deste tipo de tratamento em animais mais jovens.

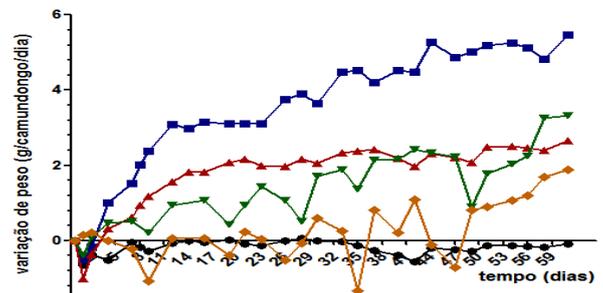


Figura 2: Variação de peso de camundongos *lit/scid* de 40 (■) e 80 dias (▲) no momento da administração de DNA plasmidial ou solução salina (●), seguida de eletroporação, nos músculos tibial anterior direito e esquerdo e de camundongos *scid* sem tratamento de 40 (▲) e 60 (◆) dias.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que os maiores níveis de hGH presentes no soro dos camundongos dos grupos tratados foram no músculo quadríceps com exposição e também no músculo tibial anterior, seguidos de eletrotransferência, utilizando um pulso alto e curto e um pulso baixo e de longa duração (HV/LV). Este tipo de eletrotransferência é interessante, pois o primeiro pulso auxilia na permeabilização celular e o segundo no transporte eletroforético do DNA através da membrana, além de ser menos invasivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Edelstein M. L., Abedi M. R., and Wixon, J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 - an update. **J. Gene Med.** 2007; 9: 833-842.
- [2] Higuti E., et.al. Growth responses following a single intra-muscular hGH plasmid administration compared to daily injections of hGH in dwarf mice. **Curr Gene Ther.** 2012; 12: 437-443.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq e FAPESP