

Eletrotransferência de um Plasmídeo Contendo o Gene de Crescimento Murino em Camundongos Anões para Obtenção de um Modelo Homólogo de Terapia Gênica *in vivo*

Eliana Rosa Lima Filha e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A terapia gênica pode ser definida pela introdução e expressão de genes recombinantes em células somáticas para tratar ou prevenir doenças. Uma vez que o gene de interesse é inserido na célula, a nova informação genética utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para expressar estes produtos gênicos (Garlick & Fenjves, 1996).

Para aumentar a eficiência da transferência do material genético, a injeção direta do plasmídeo pode ser associada à aplicação de pulsos elétricos nas células, que levam à permeabilização transiente da membrana, um processo conhecido como eletropermeabilização ou eletroporação (Golzio e col., 2004).

Nosso grupo desenvolve uma linha de pesquisa no campo da terapia gênica para deficiência do hormônio de crescimento (GHD), utilizando uma técnica não viral de injeção direta de DNA plasmidial (*naked DNA*), seguida por eletrotransferência. Com a utilização deste sistema, níveis de secreção de hormônio de crescimento humano (hGH) foram mantidos pela primeira vez, por um período de 60 dias, na circulação de camundongos anões imunodeficientes (*lit/scid*), com níveis de 1,5 a 3,0 ng hGH/mL, associado a um crescimento de ~30% desses animais (Oliveira e col., 2010).

OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é utilizar um sistema homólogo de terapia gênica *in vivo*, aplicando a técnica da eletrotransferência de um plasmídeo

contendo a sequência genômica do hormônio de crescimento de camundongo (gmGH) e o promotor da ubiquitina (UBI), em camundongos anões imunocompetentes (*lit/lit*).

METODOLOGIA

Camundongos anões da linhagem C57BL/6J-GHRHR^{LIT}/+ (*lit/lit*) foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina, via intraperitoneal. Os pêlos da região do músculo quadríceps direito foram removidos e esse músculo foi exposto para injeção do DNA ou salina. Os animais foram divididos em 3 grupos: o primeiro foi injetado com o plasmídeo pUC-UBI-gmGH (n=8), o segundo com o plasmídeo pUC-UBI-ghGH (n=7) e o terceiro com solução salina estéril (n=6). Foram aplicados 50 µg de plasmídeo diluídos em um volume de 50 µL de solução salina estéril. Logo após a injeção, o músculo injetado foi submetido à aplicação de 8 pulsos de 150 V/cm, com duração de 20 milissegundos, e um intervalo de 0,5 segundo entre cada pulso (Oliveira e col., 2010).

O peso destes animais foi monitorado diariamente até o 15º dia e depois semanalmente até o 51º dia, para o cálculo da variação de peso e da porcentagem de aumento de peso. O sangue foi coletado nos dias 15 e 45 para dosagem de mIGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina I de camundongo) e de mGH ou hGH. Os animais foram pesados também nos dias seguintes das coletas, a fim de verificar a queda de peso, após a retirada de aproximadamente 250 µL de sangue.

RESULTADOS

No 30º dia após a eletrotransferência foi obtida uma porcentagem de aumento de peso de $16,80 \pm 5,39\%$ para o grupo pUC-UBI-gmGH, $8,50 \pm 5,30\%$ para o grupo pUC-UBI-ghGH e $7,03 \pm 1,13\%$ para o grupo salina, enquanto na Figura 1 é mostrado o perfil da variação de peso desses animais durante o experimento. A partir do 30º dia, foi observado um aumento na variação de peso do grupo que recebeu salina, o qual apresentou um aumento significativo, em relação ao tempo 0, no 37º dia, o que nos leva à conclusão de que o aumento de peso dos grupos que receberam DNA após o 30º dia, foi influenciado por um crescimento dos animais em todos os grupos. Nos 16º e 46º dias foi observada uma queda da variação de peso, a qual é devida à coleta de sangue dos animais nos dias anteriores a estas pesagens. Salientamos que este ensaio continua em andamento.

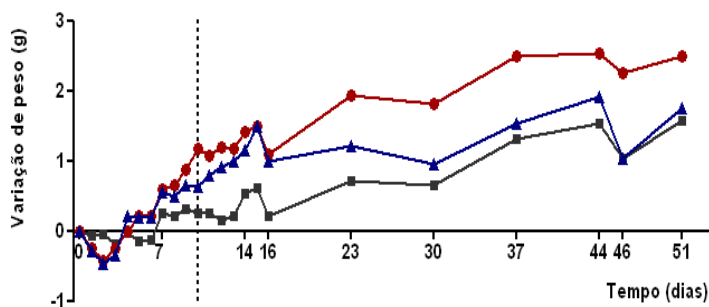


Figura 1: Variação de peso de camundongos anões *lit/lit* após injeção intramuscular de 50 µg do plasmídeo pUC-UBI-gmGH (-●-), pUC-UBI-ghGH (-▲-) ou salina (-■-), seguida de eletrotransferência.

Os níveis de mIGF-I, determinados no 15º dia no soro dos animais que receberam os plasmídeos, foram significativamente maiores em relação ao grupo controle. O grupo pUC-UBI-gmGH apresentou uma concentração de $79,81 \pm 20,28$ ng/mL, aparentemente superior a de $53,86 \pm 21,27$ ng/mL apresentada pelo grupo pUC-UBI-ghGH, enquanto a concentração de mIGF-I

para o grupo salina foi de apenas $28,61 \pm 5,84$ ng/mL.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o sistema homólogo (mGH) parece ser mais eficiente em relação ao heterólogo (hGH), com relação ao aumento de peso e níveis de mIGF-I dos camundongos *lit/lit*. Uma possível explicação para este fato é de que os animais imunocompetentes apresentam uma resposta imunogênica frente à administração do plasmídeo contendo o gene do GH humano, tornando o uso do sistema homólogo melhor e mais adequado para este tipo de terapia gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARLICK, J.A. AND FENJVES, E.S. Keratinocyte gene transfer and gene therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 7, p. 204-221, 1996.
- GOLZIO, M., ROLS, M.P. AND TEISSIÉ J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods*, v. 33, p. 126-135, 2004.
- OLIVEIRA, N.A.J., CECCHI, C.R., HIGUTI, E., OLIVEIRA, J.E., JENSEN, T.G., BARTOLINI, P. AND PERONI, C.N. Long-term hGH expression and partial phenotypic correction by plasmid-based gene therapy in an animal model of isolated GH deficiency. *J. Gene Med.*, v.12, p. 580-585, 2010.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPESP