

Comparação da eficiência entre vetores contendo a sequência complementar com ou sem a região *downstream* (3') do hormônio de crescimento humano em células HEK-293

Rafael da Silva Costa e Cibele Nunes Peroni
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH) é secretado pelas células somatotróficas da glândula hipófise anterior, sendo regulado por diversos fatores, entre eles o hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH) [1].

A deficiência de hormônio de crescimento (GHD) pode ser causada por fatores como herança genética e disfunção hipofisária ou hipotalâmica [2].

O GHRH, produzido pelo hipotálamo, age sobre as células somatotróficas da hipófise anterior e estimula o receptor transmembrana, o que resulta na transcrição e secreção do GH [3].

Um dos tratamentos que tem sido empregado em pacientes com GHD é a administração de GH recombinante, o qual pode ser obtido em uma quantidade ilimitada em sua forma pura, porém ainda por um custo relativamente alto. Uma alternativa a esse tratamento seria a terapia gênica, que consiste em realizar a transferência gênica por meio de um vetor para as células somáticas do paciente [2].

Estudos que visam o tratamento da GHD utilizam vetores de expressão contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) e modelos animais para esta doença, como os camundongos anões (lit/lit) e anões imunodeficientes (lit/scid) [4].

Constatamos em ensaio preliminar que o uso do plasmídeo pcDNA 3.1 com promotor de citomegalovírus (CMV), contendo a sequência de DNA complementar (cDNA) do gene do hGH apresentou maiores níveis de expressão do hormônio *in vivo* em relação

ao DNA genômico (gDNA) do hGH [4]. Isto poderia ocorrer devido a uma maior facilidade de processamento do cDNA em relação ao gDNA pelo tecido muscular, uma vez que o cDNA não possui íntrons e regiões não codificantes do genoma, além deste resultar em um vetor de tamanho menor, o qual poderia ser mais facilmente incorporado pelas células. Por outro lado, a região *downstream* (3') de sequências genômicas é muitas vezes conhecida por conter sequências complementares do sinal de poliadenilação, as quais podem melhorar a eficiência do RNA mensageiro [5]. Por este motivo, vetores contendo o cDNA ou o cDNA acrescido da região *downstream* (cDNA-3') do hGH serão comparados quanto aos níveis de expressão de hGH *in vitro*.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma comparação da eficiência entre vetores de expressão contendo o cDNA ou cDNA-3' do hGH em células HEK-293, uma linhagem celular derivada de rim de embrião humano.

METODOLOGIA

O plasmídeo pUC-UBI-hGH-cDNA-3' foi construído a partir dos plasmídeos pUC-UBI-hGH-gDNA e pUC-UBI-hGH-cDNA utilizando técnicas clássicas de Biologia Molecular e as enzimas de restrição Xba I e Bgl II.

Células HEK-293 foram transfectadas pelo método de lipossomos (Xfect™) com os plasmídeos pUC-UBI-hGH-cDNA ou pUC-UBI-hGH-cDNA-3' (n=3) e mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (estreptomicina e

canamicina). Após 48 horas da transfecção, o meio foi coletado e foram determinados os níveis de expressão de hGH por ensaio de imunabsorbância enzimática (ELISA) específico (Invitrogen).

RESULTADOS

O inserto do plasmídeo construído contendo o cDNA 3' do hGH foi sequenciado pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da USP, e sua correta construção foi confirmada por análise pelo programa BioEdit.

As células transfectadas com o vetor contendo o cDNA apresentaram níveis de expressão de $1,59 \pm 0,42 \mu\text{g hGH/mL}$, enquanto que as do grupo cDNA+3' expressaram $3,13 \pm 0,71 \mu\text{g hGH/mL}$ e as do grupo controle não apresentaram níveis detectáveis de hGH (Figura 1). Não houve diferença estatística entre os grupos cDNA e cDNA+3' ($P=0,056$; teste t de Student).

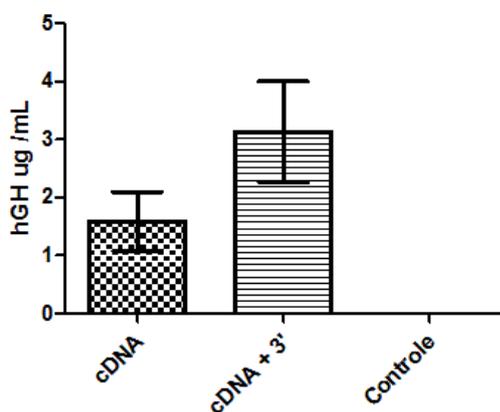


Figura 1. Níveis de hGH secretados por células HEK-293 transfectadas com os vetores cDNA e cDNA + 3' ou controle (n=3).

CONCLUSÕES

Apesar dos níveis de expressão do plasmídeo contendo a sequência complementar acrescida da região *downstream* (cDNA-3') do GH terem sido maiores do que os do plasmídeo que contém apenas a sequência complementar (cDNA), não houve diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$). Estes resultados indicam que os dois plasmídeos poderão ser utilizados por nosso grupo em estudos futuros de terapia

gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

[2] KHAMAISI, M.; SONDERGAARD, M.; SEGEV, Y.; DAGNAES-HANSEN, F.; JENSEN, T. G.; LANDAU, D.; RAZ, I.; FLYVBJERG, A. Differential effects on kidney and liver growth of a non-viral hGH-expression vector in hypophysectomized mice. Growth Horm. IGF Res. v. 17, p. 279-287, 2007.

[3] GUNAWARDANE K.; HANSEN T. K.; CHRISTIANSEN J. S., et al. Normal Physiology of Growth Hormone in Adults. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

[4] OLIVEIRA, N. A. J.; CECCHI, C. R.; HIGUTI, E.; OLIVEIRA, J. E.; JENSEN, T. G.; BARTOLINI, P.; PERONI, C. N. Long-term human growth hormone expression and partial phenotypic correction by plasmid-based gene therapy in an animal model of isolated growth hormone deficiency. *J. Gene Med.*, v. 12, p. 580-585, 2010.

[5] PROUDFOOT, N.J. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.*, v. 25, p. 1770-82, 2011.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq /PIBIC