

**HÉLCIO YOGI ONO**

**TRANSFERÊNCIA GÊNICA *IN VIVO* POR MEIO DE  
ELETROPORAÇÃO EM MÚSCULO SÓLEO DE RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.

Área de Concentração:  
Biologia Celular e Tecidual

Orientador:  
Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo  
2008

## RESUMO

ONO, H.Y. **Transferência gênica *in vivo* por meio de eletroporação em músculo sóleo de ratos Wistar**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pulsos elétricos com o objetivo de introduzir transgenes em células, a eletroporação, tem sido utilizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, atingindo índices de transferência gênica significativos. A expressão de transgenes *in vivo* pode ser considerada uma ferramenta, em potencial, bastante útil para o estudo de mecanismos biológicos, bem como para a terapia gênica. A utilização do processo de eletroporação direta em tecido muscular tem se mostrado interessante devido à grande resistência das células musculares à injúria e também pela alta capacidade regenerativa dos tecidos, fatos que permitem a utilização de pulsos elétricos. Desta forma, a eletroporação pode ser útil para o estudo de variados aspectos da plasticidade muscular, tais como controle trófico e regeneração. A proposta deste trabalho é a padronização do método de eletroporação direta (utilizando eletrodos) em músculo sóleo de ratos Wistar. Através de acesso cirúrgico, o músculo sóleo foi isolado e exposto. Após injeção de Hialuronidase foi realizada a introdução de plasmídeos (pCLGFPA) associados a um marcador de eficiência de transferência gênica, GFP (*Green Fluorescence Protein*), seguida de eletroporação. Deste processo físico, pudemos variar a voltagem, o número de pulsos e duração do pulso. O objetivo principal foi à busca de um parâmetro ideal onde deveria haver a menor lesão tecidual com a maior quantidade de expressão do GFP. A observação da fluorescência permitiu a avaliação qualitativa do grau de expressão de GFP nas diversas condições experimentais. A análise histológica, apresentada através dos cortes transversais do músculo sóleo corados por HE (hematoxilina-eosina), mostrou o grau de agressão tecidual causada pela corrente elétrica aplicada, associada à injeção de hialuronidase e plasmídeos. Ambos os métodos de análise foram utilizados para a determinação da eficiência de transferência gênica, onde se considerou a razão entre as fibras musculares sadias emissoras fluorescência e o número total de fibras sadias. Como resultado, atingimos a taxa de eficiência de  $(50,3 \pm 20\%)$  em transferência gênica, utilizando a voltagem de 25 V, trem de 8 pulsos com duração de 20ms e frequência de 1Hz. Estes resultados sugerem que a eletroporação *in vivo* pode ser

utilizada em músculos profundos tais como o sóleo, com eficiência suficiente para induzir possíveis modificações na função muscular. A possibilidade de interferir na função deste músculo abre a perspectiva de se estudar o papel de certos genes na plasticidade muscular esquelética, especialmente no crescimento muscular longitudinal.

**Palavras-chave:** Eletroporação, músculo esquelético, músculo sóleo, plasmídeos, GFP e transferência gênica.

## ABSTRACT

ONO, H.Y. ***In vivo* gene transfer by electroporation in soleus muscle from wistar rats.** 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The use of electrical pulses for gene transfer has been successfully used to reach significant levels of gene expression *in vitro* and *in vivo*. Therefore electroporation can be considered an important device to get further insight on biological mechanisms and also to treatment. Electroporation in muscle cells are particularly attractive because these are robust cells and the tissue is capable of a great deal of regeneration, leading to the possibility to address various aspects of muscle plasticity such as trophism and regeneration. The aim of the present work is to achieve a high level of gene transfer throughout electroporation in the soleus muscle of Wistar rats. The muscle was surgically accessed, injected with Hyaluronidase and subsequently injected with a plasmid expressing GFP (Green Fluorescence Protein). Finally the muscles were electroporated in various conditions. Observation of fluorescence produced *in situ* and also HE (Hematoxylin-eosin) preparations revealed that the best gene transfer efficiency ( $50, 3 \pm 20\%$ ) was achieved with 25 V and 8 pulses (1Hz) lasting 20ms. These results point to a potential use of electroporation as a tool for investigating cellular and molecular aspects of skeletal muscle plasticity, especially those that can be approached only in soleus muscle, such as longitudinal growth.

**Keys words:** Electroporation, gene transfer, Green Fluorescence Protein, plasmid, soleus and striated skeletal muscle.

## 1 INTRODUÇÃO

A transferência de DNA (ácido desoxirribonucleico) para expressão de transgenes representa uma ferramenta poderosa para investigação de fenômenos biológicos e também possui grande potencial para aplicação terapêutica. A geração de animais transgênicos a partir da introdução de DNA em ovócitos fecundados tem sido amplamente utilizada e proporcionou grande avanço a respeito do papel dos genes em sistemas biológicos (LU et al., 2003). No entanto, no Brasil esta tecnologia ainda é de difícil acesso, e as condições estruturais exigidas são relativamente caras. Além disto, a expressão de um transgene durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal pode induzir adaptações na expressão de outros genes, que potencialmente pode gerar fenótipos próprios.

Vetores virais também têm sido utilizados com o objetivo de atingir a expressão de transgenes (HERWEIJER e WOLFF, 2003). O uso destes vetores resulta em um aumento efetivo da expressão do transgene (LU et al., 2003), e também pode contribuir substancialmente para a compreensão de sistemas biológicos. Neste método, a purificação demanda tempo razoável e existe a dificuldade de controlar a dose de vírus utilizada, com freqüente resposta imunogênica após a 1<sup>a</sup> injeção e alta taxa de citotoxicidade (BRUNETTI-PIERRI et al., 2004); (LEFESVRE et al., 2002).

Alternativamente às estratégias de transferência gênica apresentadas acima, realizou-se a injeção de DNA (na forma de plasmídeo puro) em vários órgãos (BIGEY et al., 2002) com objetivo de obter expressão tecidual restrita. Apesar de vantajoso, principalmente em relação à especificidade tecidual, a aplicação de plasmídeo puro resulta em níveis de expressão bastante baixos (aproximadamente 1%) (ACSADI et al., 1991); (DRAGHIA-AKLI e FIOROTTO, 2004); (MCMAHON e WELLS, 2004); (SCHERTZER et al., 2006); (WOLFF et al., 1990).

Subseqüentemente esta técnica foi melhorada com a eletroporação de DNA injetado (AIHARA e MIYAZAKI, 1998); (MCMAHON et al., 2001); (MENNUNI et al., 2002); (MIR et al., 1999). Este implemento aumentou substancialmente a eficiência de transferência gênica, especialmente em distrofias musculares (HOWELL et al., 1998); (MURAKAMI et al., 2003).

Entre os vários tecidos estudados, interessantemente o músculo esquelético se mostrou um dos mais permissivos, onde foi atingido o maior nível de expressão com injeção de DNA puro. Além disso, o músculo esquelético tem sido um dos alvos mais estudados, não somente por estar diretamente ligado ao tratamento de desordens musculares, mas também por ter potencial para expressar e secretar proteínas de genes transferidos (BETTAN et al., 2000); (BLOQUEL et al., 2004), permitir boa acessibilidade e longo tempo de expressão de transgenes (devido à longa vida destas células); (BIGEY et al., 2002); (BLOQUEL et al., 2004); (MIR et al., 1999); (MOLNAR et al., 2004).

O músculo sóleo, utilizado neste estudo, é um músculo profundo que dificulta o procedimento de injeção e eletroporação transcutânea, se não for realizado o acesso direto por técnicas cirúrgicas. No entanto, ele foi alvo de nossos experimentos por não possuir tendões internos, ser fusiforme, mono articular e quando submetido a estiramento promover robusto aumento de sarcômeros em série (GOMES et al., 2006).

O pré-tratamento muscular com hialuronidase diminui a densidade da matriz extracelular e pode melhorar significativamente o efeito da eletroporação (GOLLINS et al., 2003); (MCMAHON et al., 2001); (MENNUNI et al., 2002); (MOLNAR et al., 2004). Além de aumento de eficiência, este pré-tratamento possibilitou menor lesão tecidual (GOLLINS et al., 2003), talvez por possibilitar a utilização de uma corrente de menor voltagem.

Durante a eletroporação, um gradiente de voltagem é produzido, submetendo o tecido alvo a uma corrente elétrica, preferencialmente unipolar, de baixa intensidade ( $\leq 200$  volts(V)) e longa duração (MIR et al., 1999) e com patamar de duração de pulso regular “onda quadrada” (BLOQUEL et al., 2004). Desta forma é possível controlar a voltagem, o tempo de exposição a esta corrente (tamanho do pulso em ms), o número de pulsos e frequência. Este procedimento produz poros temporários (MOLNAR et al., 2004), com diâmetro da ordem de nanômetros, na membrana das células musculares permitindo que plasmídeos ou macromoléculas do meio extracelular as penetrem (TAYLOR et al., 2004). A endocitose passiva, talvez seja o transporte pelo qual o plasmídeo penetre a célula, mas ainda não existe uma via de transporte descrita e comprovada para o mesmo (BLOQUEL et al., 2004); (SATKAUSKAS et al., 2002). As condições que afetam a eficiência da transferência gênica através do método de eletroporação incluem ainda diversos fatores não

citados anteriormente, como tamanho do plasmídeo, a concentração e o volume da injeção, o tempo entre injeção e eletroporação, a idade do animal e o tamanho dos músculos a serem injetados (WANG et al., 2005).

O plasmídeo utilizado em nossos experimentos expressa GFP (*Green Fluorescent Protein*) e é denominado, “pCLGFPA”. Este plasmídeo tem aproximadamente 6.0 Kb, tamanho que favorece a penetração pelos poros abertos no processo de eletroporação. Posteriormente a fluorescência emitida pelo GFP é facilmente detectada em um microscópio confocal.

Neste trabalho propomos a padronização do método de eletroporação *in vivo* associado à hialuronidase aplicado em músculo esquelético (sóleo) com injeção do plasmídeo “pCLGFPA” contendo promotor viral CMV (citomegalovírus) à montante da região codante do gene GFP. Após esta padronização a expectativa para projetos posteriores é sistematicamente modificar a expressão de proteínas musculares, e analisar alterações de função tais como capacidade de resposta hipertrófica e regenerativa muscular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Transferência gênica

A palavra vetor, que deriva do Latim *vetor* (aquele que carrega, entrega), define o agente que constitui ou contém os genes a serem transferidos e expressos em uma célula receptora. Diversos tipos de vetores são utilizados com o objetivo de levar o DNA ao núcleo das células alvo (DANI, 1999). Um vetor ideal seria aquele que pudesse acomodar um tamanho ilimitado de DNA inserido, fosse disponível em uma forma concentrada, pudesse ser facilmente produzido, pudesse ser direcionado para tipos específicos de células, não permitisse replicação autônoma do DNA, pudesse garantir uma expressão gênica a longo prazo, fosse não-tóxico e não imunogênico. Tal vetor ainda não existe e nenhum dos sistemas de entrega de DNA atualmente disponíveis para transferência gênica *in vivo* é perfeito com respeito a qualquer um desses pontos (DANI, 1999).

A maneira mais simples de transferir genes para células e tecidos é através da inoculação de DNA puro, com técnicas de micro injeção, método biobalístico e eletroporação. Métodos mais elaborados e mais eficientes incluem a administração de DNA encapsulado, os lipossomos. Porém, estes vetores químicos, ainda demonstram falta de segurança e eficiência *in vivo* (ANDRE e MIR, 2004).

Ainda como processos mais complexos, temos os vetores virais, que podem ser fragmentos de DNA de vírus contendo o DNA a ser transferido; ou mesmo a partícula viral formada por proteínas virais empacotando um DNA viral modificado de maneira a tornar o vetor menos tóxico, menos patogênico ou não-patogênico.

Vetores não virais, utilizando plasmídeos com DNA, são menos efetivos do que os vetores virais quando falamos de nível de expressão. No entanto, eles oferecem inúmeras vantagens, como toxicidade reduzida, produção mais simples e com baixo custo, segurança, especificidade tecidual e parece não se limitarem ao tamanho do DNA (BIGEY et al., 2002).

A injeção direta de DNA, não associada a processos físicos, em músculo esquelético, apesar de simples, apresenta baixa taxa de eficiência de transferência gênica, com valor aproximado de 1% de eficiência (ACSADI et al., 1991); (WOLFF et al., 1990).

O método hidrodinâmico, visa à injeção rápida, em um tronco vascular, de grandes volumes de solução contendo DNA. Esta técnica apresentou resultados eficientes na

transfecção de células hepáticas, mas com importantes alterações sistêmicas colaterais (TOUMI et al., 2006); (ZHANG et al., 2004).

Outro vetor físico, a biobalística ou “*gene gun*”, utiliza micro partículas de ouro onde são encapsulados os plasmídeos, para que posteriormente sejam projetados, em alta pressão, em direção a um anteparo (geralmente a pele), conseguindo uma transfecção precisa, mas muito localizada e em quantidade diminuída (WALTHER et al., 2002).

A sonoporação, que utiliza o efeito ultrassônico, para permeabilizar membranas, tem sido desenvolvido, mas os resultados ainda indicam a necessidade de melhor elaboração (YAMASHITA et al., 2002).

A eletroporação que utiliza a corrente elétrica, para abertura de poros na membrana celular, combinada com a injeção de DNA puro, tem sido rapidamente desenvolvida, devido às limitações e riscos inerentes ao uso dos vetores virais (BRUNETTI-PIERRI et al., 2004); (LEFESVRE et al., 2002). O processo de eletroporação, associado à injeção de DNA, aumentou o valor de eficiência de transferência gênica, tornando este método uma importante ferramenta para estudos de fenômenos biológicos e terapia gênica, apresentando vantagens como o baixo custo, fácil preparo e segurança na produção e utilização (BLOQUEL et al., 2004). Este é o método não viral que apresenta maior eficiência de transferência gênica (AIHARA e MIYAZAKI, 1998); (MATHIESEN, 1999); (MIR et al., 1998); (ROLS et al., 2000); (VICAT et al., 2000).

A primeira demonstração de que o DNA poderia ser transferido para o interior de células vivas, através da eletroporação, foi feito por Neumann et al. em 1982 (NEUMANN et al., 1982). Mais de dois anos foram necessários para que o segundo trabalho fosse publicado, onde se realizou experimentos em células eucarióticas *in vitro* (POTTER et al., 1984).

Em 1985, J. Tessié et al. desenvolveram um aparelho gerador de pulsos elétrico quadrados, adaptado a suspensão celular utilizada no modelo *in vitro* (ZERBIB et al., 1985).

Em 1990, Jon Wolf et al. mostraram que a injeção de DNA puro, em músculo esquelético, *in vivo*, resultava em baixa expressão genética e de níveis variados. Não demorou muito tempo para que se pensasse na combinação de injeção de DNA e

eletroporação. Assim, em 1991, Timotov e colaboradores, transfectaram oncogenes na pele, obtendo os primeiros resultados positivos de eletroporação *in vivo*.

Heller et al. em 1996 (HELLER et al., 1996), utilizaram trem de pulsos exponenciais (100µs) em tecido hepático, utilizando marcadores associados a DNA, e atingiram níveis razoáveis de transferência gênica, quando comparados a injeção pura. Em 1998, quatro grupos de pesquisadores, trabalhando em tecidos distintos, consistentemente demonstraram bons níveis de transferência gênica, utilizando logos pulsos (5-50ms). MP Rols e J. Tessié, trabalharam em tumores, Suzuki et al. em fígado, Aihara e Miazaki e Mir et al. em tecido muscular esquelético (ANDRE e MIR, 2004).

Mir et al. em 1999, publicaram os resultados da utilização de pulsos idênticos e variações de duração de pulso, voltagem, número de pulsos, frequência e distância de eletrodos. Destes estudos, surgiu como referência, o parâmetro de 200 V, 8 pulsos, duração de 20ms e frequência de 1Hz, para eletroporação *in vivo*.

Lucas e Heller, em 2001, iniciaram os estudos comparando pulsos longos e curtos, demonstrando que o nível de expressão, foi maior e mais duradouro, utilizando os pulsos longos. No entanto, o uso de trem de vários pulsos idênticos, na ordem de milissegundos de duração, resultou no aumento de expressão de transgenes injetados em vários tecidos (BLOQUEL et al., 2004).

Trabalhos recentes tem se desenvolvido para buscar a melhor taxa de transferência gênica em detrimento da menor lesão tecidual.

## **2.2 Músculo esquelético e eletroporação**

O músculo é o tecido mais amplamente utilizado em eletroporação, pois oferece diversas vantagens como, acessibilidade, expressão duradoura de transgene, que em algumas situações, duram mais de um ano, devido à longa vida da célula muscular (MIR et al., 1999).

Wolff et al. (1990), reforçam que estas vantagens observadas em tecido muscular, são devido suas características multinuclear, de retículo sarcoplasmático e da existência de sistema de túbulos transversos, que por conter fluido extracelular, permite a profunda difusão do material injetado entre as células musculares.

Bettan et al. (2000), citam que maior vantagem do músculo eletroporado, é seu potencial para produção e liberação de proteínas bioativas na corrente sanguínea, produzindo efeitos em alvos locais ou sistêmicos.

Como desvantagem, o músculo esquelético apresenta barreiras naturais à penetração de substâncias, como matriz extracelular densa, e regiões fibrosas como endomísio e perimísio, além de tendões intermusculares (DAVIS et al., 1993). Assim, utilizou-se uma enzima, chamada hialuronidase, que diminuía a tensão da matriz extracelular, permitindo uma maior penetração do transgene no tecido muscular (BLOQUEL et al., 2004).

O músculo sóleo, utilizado neste estudo, é um músculo profundo que não permite o procedimento de injeção e eletroporação transcutânea, e deve ser eletroporado através do acesso direto, utilizando técnicas cirúrgicas. Este músculo foi alvo de nossos experimentos por não possuir tendões internos, ser fusiforme e quando submetido a estiramento promover robusto aumento de sarcômeros em série (GOMES et al., 2006).

### **2.3 As correntes elétricas na eletroporação**

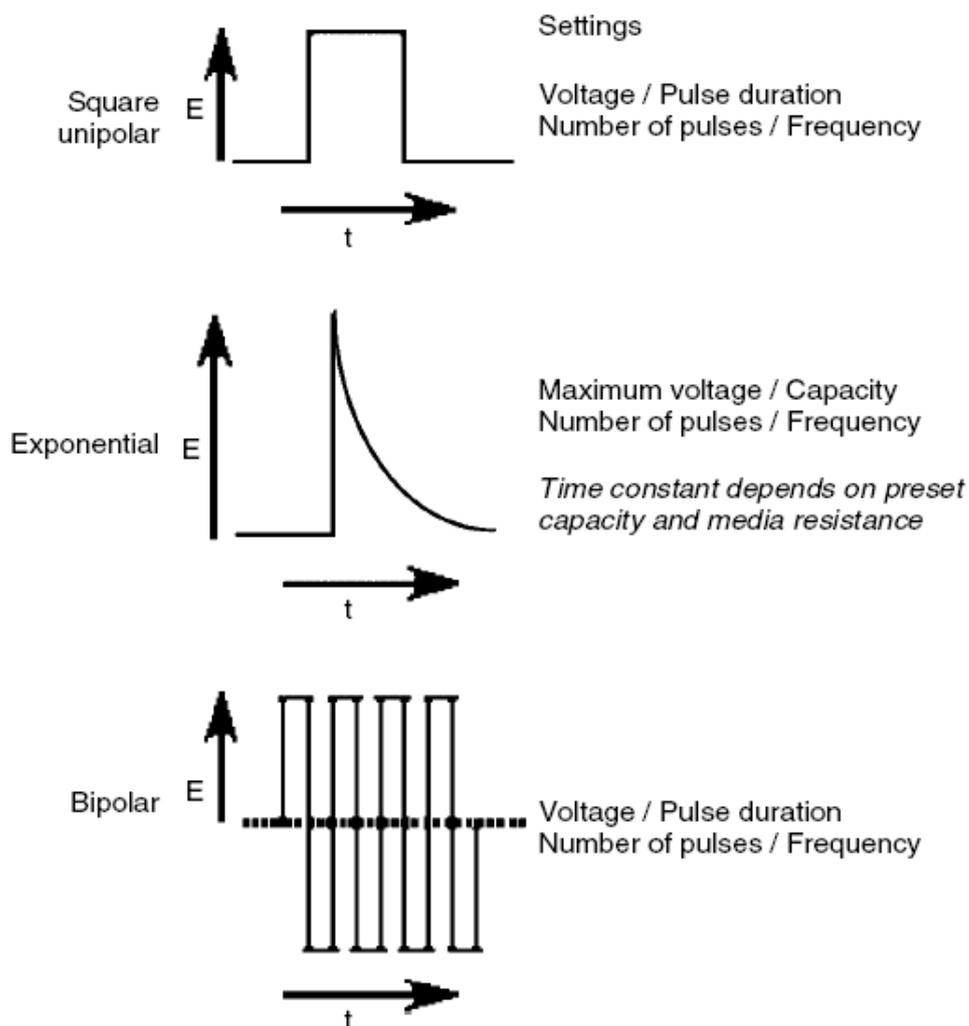
A exposição de células vivas a pulsos elétricos curtos e intensos induz mudanças no potencial de membrana, sendo estes dependentes da variação da posição e intensidade do campo elétrico (ANDRE e MIR, 2004).

A eletropermeabilização depende do raio de curvatura da célula e tende a ocorrer em maior intensidade onde nos pontos onde a membrana é perpendicular ao campo elétrico (GOLLINS et al., 2003).

Na literatura tem sido mostrado que é possível eletroporar músculos superficiais através da aplicação de eletrodos externos ou agulhas (TJELLE et al., 2006). O uso de eletrodos externos visa a eletroporação de tecidos superficiais e encontram como desvantagem principal a resistência elétrica da pele que dificulta a eletroporação em músculos profundos (BURGESS et al., 2007). Com eletrodos do tipo agulha, é possível alcançar tecidos mais profundos, mas o campo elétrico é menos uniforme e tende a concentrar-se próximo as agulhas (GEHL e MIR, 1999). Além disso, com estes eletrodos, o campo elétrico próximo a agulha é extremamente alto, diminuindo progressivamente à medida que se afasta desta. Sendo assim o campo elétrico é mais homogêneo com eletrodos tipo placa (BLOQUEL et al., 2004).

Diversos tipos de eletrodos têm sido desenvolvidos, buscando melhor adaptação ao tecido escolhido, permitindo um campo elétrico mais uniforme (DONA et al., 2003). Os eletrodos em forma de placa, maciços ou perfurados, permitem que estas características sejam alcançadas e proporcionem melhores resultados quando aplicados diretamente em tecido muscular (TAYLOR et al., 2004).

Os diversos tipos de aparelhos eletroporadores produzem alguns tipos de pulsos elétricos diferentes (Fig. 1). O tipo exponencial é frequentemente utilizado em experimentos *in vitro*, onde o tempo do pulso é dependente da resistência elétrica do tecido. Os pulsos de onda quadrados são preferentemente indicados para experimentos *in vivo*, onde a voltagem e a duração dos pulsos podem ser variadas independentemente da resistência elétrica do tecido. O pulso de onda quadrado unipolar é o mais utilizado para os experimentos de eletroporação enquanto que o bipolar é preferido em eletro fisioterapia (MATHIESEN, 1999).



<b>Figura 1-</b>	Representação gráfica dos diferentes tipos de pulsos elétricos utilizados em eletroterapia (BLOQUEL et al. 2004).
------------------	---

O plasmídeo contendo DNA é injetado dentro do tecido e pulsos elétricos são liberados através de eletrodos (tipo agulha ou placas), posicionados em cada lado da região injetada, sendo estes ligados ao aparelho eletroporador. O campo elétrico produzido depende do tipo de eletrodo, resultando em uma variável efetividade de campo na área tratada ( $V/mm^2$ ). Outro ponto crítico, é que a eficiência de eletroporação, depende da orientação da direção do campo elétrico em relação à membrana celular (TEISSIE e ROLS,

1993). Vários tipos de campos elétricos têm sido propostos, e o cálculo matemático tem sido utilizado para melhor medir a intensidade e uniformidade do campo elétrico.

A desestabilização da membrana induzida por pulsos elétricos permite não somente a permeabilização da mesma, mas também o processo de eletroforese do DNA (BLOQUEL et al., 2004); (BUREAU et al., 2000); (SATKAUSKAS et al., 2002). Este fato causa vários efeitos como movimentação de DNA dentro da célula permeabilizada e a possibilidade de inserção de DNA, mas também possibilita a entrada de radicais livres, o que poderia ser um indicador de citotoxicidade (BLOQUEL et al., 2004). Bonaffous et al., em 1999, citam o aumento de radicais livres no meio intracelular, após a eletroporação. Esta citotoxicidade também pode ser causada pela alteração da composição do meio intracelular no momento em que a membrana é permeabilizada por este método (BIGEY et al., 2002).

Condições eficientes de eletroporação celular *in vivo*, dependem também do tipo de tecido. Como citado anteriormente, a resistência elétrica dos tecidos, posição e tipo de eletrodos, e a forma de contato (direto ou transcutânea), são variáveis importantes para o estabelecimento de uma metodologia de estudo.

Condições otimizadas de eletroporação, não resultam apenas um aumento da transfecção, mas também uma diminuição de lesão tecidual causada pelo campo elétrico. Além dos danos teciduais, a toxicidade deve ser ressaltada, pois a eletroporação, abre poros na membrana celular e permite a troca entre meio interno e externo.

Experimentos mostram que após a aplicação da corrente elétrica adequada, os tecidos permanecem permeabilizados por alguns minutos (GEHL et al., 2002); (MIR et al., 1999); (SATKAUSKAS et al., 2002), até se recuperarem, selando os poros. Este selamento acontece em condições ideais de eletroporação, onde a permeabilização não é um efeito térmico, isto é, sem a desnaturação de proteínas (ANDRE e MIR, 2004). O processo inflamatório relatado em todos os experimentos *in vivo*, apresenta uma completa recuperação em até duas semanas (HARTIKKA et al., 2001).

Outro efeito da eletroporação, citado em literatura, é o reflexo de vasoconstrição reversível em arteríolas, que pode alterar a distribuição de drogas no organismo, mas em contrapartida pode ajudar o processo de eletroporação, mantendo o DNA injetado por mais tempo no local injetado (GEHL et al., 2002).

Perspectivas apontam para o uso de correntes de alta voltagem e mínimo tempo de aplicação, seguidos de pulsos de baixa voltagem e longo tempo de duração (CUKJATI et al., 2007); (PAVSELJ e PREAT, 2005).

## **2.4 O uso da hialuronidase com eletroporação**

A hialuronidase é uma enzima que hidrolisa o ácido hialurônico, polímero viscoso que geralmente localiza-se no interstício celular. O ácido hialurônico tem a propriedade de manter as células aderidas umas às outras. Por ação da hialuronidase, o polímero é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo significativamente sua viscosidade e facilitando a difusão dos componentes injetados para o interior das células.

O pré-tratamento com hialuronidase, anterior a injeção de plasmídeo, pode aumentar significativamente a eficiência de transferência gênica, comparado a eletroporação sozinha (MCMAHON et al., 2001); (MENNUNI et al., 2002). Tem sido relatado um aumento de eficiência de transferência gênica, com valores próximos de 10% (VICAT et al., 2000) a 37% (VILQUIN et al., 2001) e até 50% em musculatura não distrófica, associando o tratamento prévio de hialuronidase ao método de eletroporação (GOLLINS et al., 2003); (MCMAHON et al., 2001).

Gollins et al. (2003), descrevem experimentos onde a concentração de hialuronidase entre 10-40U não apresentou diferenças estatísticas significativas nos resultados.

No músculo esquelético, além do aumento geral de fibras transfetadas, o uso desta enzima, permite a redução da voltagem que se necessita para realizar a transferência gênica, diminuindo também, o grau de lesão muscular (MCMAHON et al., 2001).

Utilizamos 0.4U/ $\mu$ l de hialuronidase ovina em solução salina, PBS (*Phosphate buffered saline*). A variação de quantidade utilizada não alterou significativamente os resultados obtidos (dados não mostrados), mas o uso de enzimas em músculo esquelético parece ter fundamental importância para difusão do plasmídeo nas fibras musculares, aumentando o percentual de transferência de DNA pela eletroporação (GOLLINS et al., 2003).

## **2.5 Variáveis relativas aos animais de experimentação utilizados em eletroporação**

Desde os relatos de experimentos iniciais, muitos fatores têm sido investigados para melhorar a transfecção de plasmídeos, como a escolha do tamanho do plasmídeo, a solução utilizada, a técnica de injeção e ainda gênero e idade dos animais (GOLLINS et al., 2003).

Gollins et al. (2003), relatam que em experimentos de eletroporação, utilizando camundongos de ambos os sexos, não houve diferenças estatísticas significativas entre eles. Em relação à idade do animal, os ratos jovens e os maduros utilizados em experimentos, não apresentam resultados estatisticamente diferentes entre si. Mas os ratos com idades mais avançadas, superiores há 10 semanas, apresentaram menor eficiência de transferência gênica (WANG et al., 2005).

A eficiência da transferência de plasmídeos em tecido muscular é alta em jovens e pequenos roedores, mas diminui em espécies maiores, possivelmente devido ao nível de tecido conectivo presente no músculo (GOLLINS et al., 2003).

O tamanho dos músculos a serem eletroporados está diretamente relacionado com a adaptação do eletrodo ao músculo e ao tamanho do animal (GOLLINS et al., 2003).

O tempo entre a injeção e eletroporação também tem sido discutido, pois existe uma porção da injeção que fica no interstício celular, no meio extracelular (sofrendo degradação pelas DNases endógenas), e outra parte que é perdida na circulação sanguínea (BUREAU et al., 2004). O uso de inibidores de DNase com a injeção de plasmídeos puros, resultou em pequeno aumento da taxa de eficiência de transferência gênica, mas causou importante aumento da lesão tecidual (SCHERTZER et al., 2006).

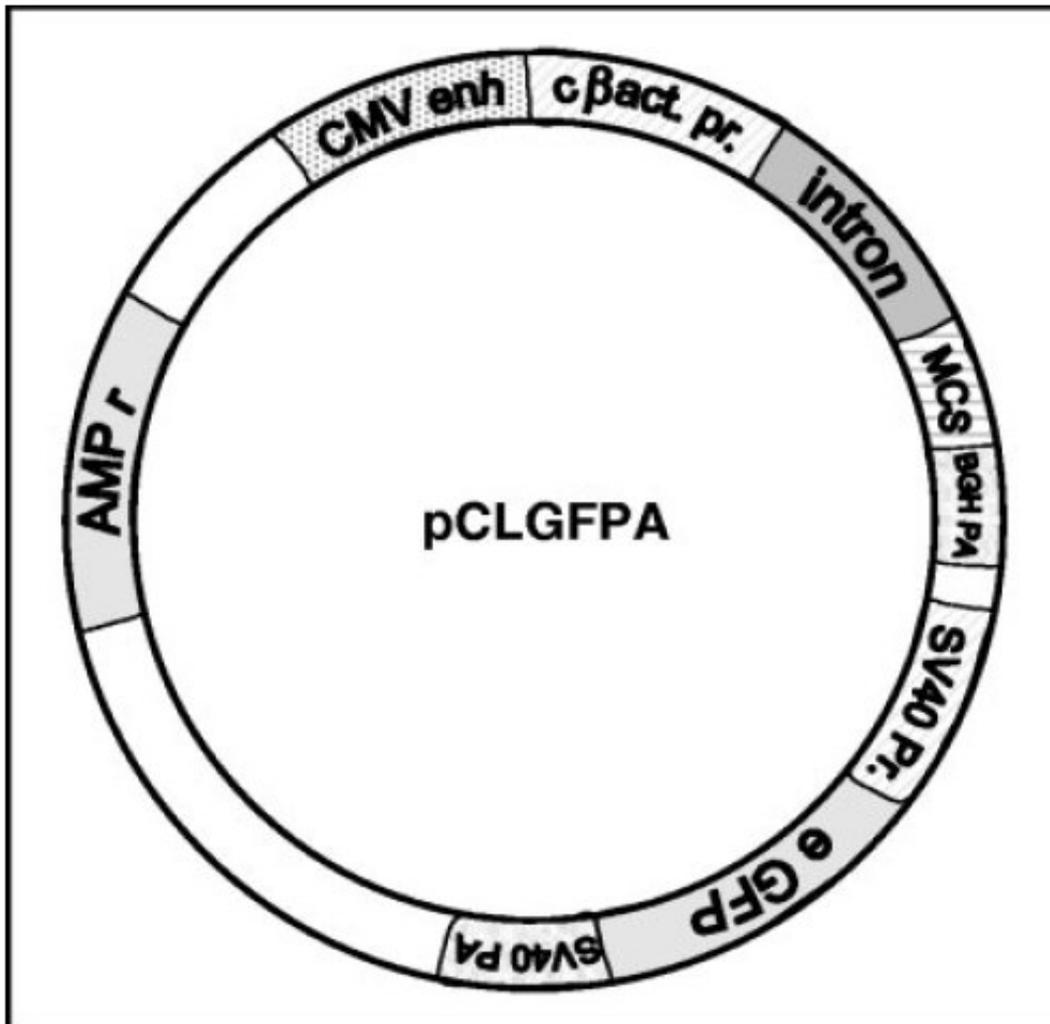
## **2.6 Variáveis relativas ao Plasmídeo utilizado em eletroporação**

Molnar et al. (2004), citam o tamanho do plasmídeo como fator importante na eficiência de transferência gênica. Em seus estudos, utilizaram plasmídeos de tamanhos variados (de 9 a 19 Kb), e concluíram que plasmídeos grandes são ineficientemente transportados para dentro de fibras musculares, utilizando o método de eletroporação. Portanto, o tamanho do plasmídeo parece ter influência direta no processo de eletroporação (GOLZIO et al., 2004). Utilizamos em nossos experimentos, o plasmídeo medindo

aproximadamente 6.0 Kb, em que podemos ainda inserir um gene de interesse, no futuro, sem dificultar o processo de transfecção.

O plasmídeo utilizado neste estudo foi construído sob a técnica de clonagem molecular no *Christophe Marcelle Laboratory*, (SCAAL et al., 2004), sendo que o vetor “pCLGFPA” contém um citomegalovírus (CMV) como promotor (Fig. 2). A concentração utilizada foi de 1µg/µl em PBS com volume injetado de 50µl.

Este plasmídeo possui como marcador de funcionamento, o GFP. A clonagem do gene GFP de um tipo de água-viva (*Aequorea victoria*) possibilitou a expressão da proteína em sistemas heterólogos. A proteína GFP, quando expressa em células procarióticas ou eucarióticas, produz uma fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou UV. A proteína GFP do tipo selvagem possui uma única cadeia polipeptídica de 238 aa. Esta exibe dois picos de absorbância máxima de luz, a 395 nm e a 475 nm. A excitação a 395 nm (azul) resulta em uma fluorescência a 508 nm (verde); (TSIEN, 1998). A meia vida do GFP é de aproximadamente 26 horas (CORISH e TYLER-SMITH, 1999).



**Figura 2** – Representação gráfica do plasmídeo pCLGFPA.  
(SCAAL, 2004).

## 6 CONCLUSÕES

O método de injeção de DNA associado ao processo de eletroporação é uma estratégia viável para transferência gênica, provavelmente com eficiência suficiente para manipular aspectos estruturais e funcionais no músculo sóleo.

Os parâmetros elétricos otimizados para a transferência gênica em músculo sóleo de rato por eletroporação são: 25V em um eletrodo retangular com área de 15 mm<sup>2</sup> (1,6V/mm<sup>2</sup>), 20ms de duração de pulso, 8 pulsos (intervalo de 1 segundo entre os pulsos) com corrente unipolar (pulso quadrado).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSADI, G. *et al.* Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. **Nature**, v. 352. n. 6338, p. 815-8, 1991.

AIHARA, H.; MIYAZAKI, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. **Nat. Biotechnol.**, v. 16. n. 9, p. 867-70, 1998.

ANDRE, F.; MIR, L. M. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. **Gene Ther.**, v. 11, Suppl 1, p. S33-42, 2004.

BABIUK, S. *et al.* Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. **J. Biotechnol.**, v.110, n.1, p.1-10, 2004.

BETTAN, M. *et al.* High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. **Mol. Ther.**, v.2, n.3, p.204-10, 2000.

BIGEY, P. *et al.* In vivo plasmid DNA electrotransfer. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, n. 5, p. 443-7, 2002.

BLOQUEL, C. *et al.* Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. **J. Gene Med.**, v. 6, Suppl 1, p. S11-23, 2004.

BRUNETTI-PIERRI, N. *et al.* Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. **Hum. Gene Ther.**, v. 15, n. 1, p. 35-46, 2004.

BUREAU, M. F. *et al.* Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, n. 3, p. 353-9, 2000.

BUREAU, M. F. *et al.* Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1676, n. 2, p. 138-48, 2004.

BURGESS, S. E. *et al.* Resealing of electroporation of porcine epidermis using phospholipids and poloxamers. **Int. J. Pharm.**, v. 336, n. 2, p. 269-75, 2007.

---

De acordo:

CLAUSEN, T.; GISSEL H. Role of Na,K pumps in restoring contractility following loss of cell membrane integrity in rat skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 183, n. 3, p. 263-71, 2005.

CORISH, P.; TYLER-SMITH C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. **Protein Eng.**, v. 12, n. 12, p. 1035-40, 1999.

CROZE, F.; PRUD'HOMME, G. J. Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. **J. Gene Med.**, v. 5, n. 5, p. 425-37, 2003.

CUKJATI, D. *et al.* Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 501-7, 2007.

DANI, S. U. The challenge of vector development in gene therapy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 2, p. 133-45, 1999.

DAVIS, H. L. *et al.* Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. **Hum. Gene Ther.**, v. 4, n. 2, p. 151-9, 1993.

DIAO, W. F. *et al.* Serum, liver, and kidney proteomic analysis for the alloxan-induced type I diabetic mice after insulin gene transfer of naked plasmid through electroporation. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5837-45, 2006.

DONA, M. *et al.* Functional in vivo gene transfer into the myofibers of adult skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 312, n. 4, p. 1132-8, 2003.

DRAGHIA-AKLI, R. ; FIOROTTO, M. L. A new plasmid-mediated approach to supplement somatotropin production in pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 82, E-Suppl, p. E264-269, 2004.

GEHL, J. ; MIR, L. M. Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 261, n. 2, p. 377-80, 1999.

GEHL, J. *et al.* Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1569, n. 1-3, p. 51-8, 2002.

GOLLINS, H. *et al.* High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. **Gene Ther.**, v. 10, n. 6, p. 504-12, 2003.

GOLZIO, M. *et al.* In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. **Methods**, v. 33, n. 2, p. 126-35, 2004.

GOMES, A. R. *et al.* The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogen-1 gene expressions. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 87, n. 2, p. 241-6, 2006.

HARTIKKA, J. *et al.* Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. **Mol. Ther.**, v. 4, n. 5, p. 407-15, 2001.

HELLER, R. *et al.* In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. **FEBS Lett.**, v. 389, n. 3, p. 225-8, 1996.

HERWEIJER, H.; WOLFF, J. A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. **Gene Ther.**, v. 10, n. 6, p. 453-8, 2003.

HORIKI, M. *et al.* Needleless in vivo gene transfer into muscles by jet injection in combination with electroporation. **J. Gene Med.**, v. 6, n. 10, p. 1134-8, 2004.

HOWELL, J. M. *et al.* High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: prolongation of expression with immunosuppression. **Hum. Gene Ther.**, v. 9, n. 5, p. 629-34, 1998.

JANG, H. S. *et al.* A novel ex vivo angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle. **Mol. Ther.**, v. 9, n. 3, p. 464-74, 2004.

LEFESVRE, P. *et al.* A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer. **BMC Mol. Biol.**, v. 3, p. 12, 2002.

LU, Q. L. *et al.* Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. **Gene Ther.**, v. 10, n. 2, p. 131-42, 2003.

LUCAS, M. L.; HELLER, R. Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. **Mol. Ther.**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 2001.

MAGEE, T. R. *et al.* Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. **J. Gene Med.**, v. 8, n. 9, p. 1171-81, 2006.

MATHIESEN, I. Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. **Gene Ther.**, v. 6, n. 4, p. 508-14, 1999.

MCMAHON, J. M. *et al.* Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase: increased expression with reduced muscle damage. **Gene Ther.**, v. 8, n. 16, p. 1264-70, 2001.

MCMAHON, J. M. e WELLS, D. J., Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status. **Bio. Drugs**, v. 18, n. 3, p. 155-65, 2004.

- MENNUNI, C. *et al.* Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. **Hum. Gene Ther.**, v. 13, n. 3, p. 355-65, 2002.
- MIR, L. M. *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, n. 8, p. 4262-7, 1999.
- MIR, L. M. *et al.* Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 321, n. 11, p. 893-9, 1998.
- MIYABARA, E. H. *et al.* Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 290, n. 4, p. C1128-38, 2006.
- MOLNAR, M. J. *et al.* Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. **Mol. Ther.**, v. 10, n. 3, p. 447-55, 2004.
- MURAKAMI, T. *et al.* Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. **Muscle Nerve**, v. 27, n. 2, p. 237-41, 2003.
- NEUMANN, E. *et al.* Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. **Embo. J.**, v. 1, n. 7, p. 841-5, 1982.
- PAVSELJ, N. ; PREAT, V. DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. **J. Control Release**, v. 106, n. 3, p. 407-15, 2005.
- POTTER, H. *et al.* Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 81, n. 22, p. 7161-5, 1984.
- ROLS, M. P. *et al.* Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. **Melanoma Res.**, v. 10, n. 5, p. 468-74, 2000.
- ROLS, M. P. *et al.* Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression. **Eur. J. Biochem.**, v. 254, n. 2, p. 382-8, 1998.
- SATKAUSKAS, S. *et al.* Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis. **Mol. Ther.**, v. 4, n. 4, p. 317-23, 2001.
- SATKAUSKAS, S. *et al.* Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. **Mol. Ther.**, v. 5, n. 2, p. 133-40, 2002.

- SCAAL, M. *et al.* In ovo electroporation of avian somites. **Dev. Dyn.**, v. 229, n.3, p.643-50, 2004.
- SCHAKMAN, O. *et al.* Insulin-like growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1789-97, 2005.
- SCHERTZER, J. D. *et al.* Optimizing plasmid-based gene transfer for investigating skeletal muscle structure and function. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 4, p. 795-803, 2006.
- TAYLOR, J. *et al.* Optimization of ectopic gene expression in skeletal muscle through DNA transfer by electroporation. **BMC Biotechnol.**, v. 4, p. 11, 2004.
- TEISSIE, J.; ROLS, M. P. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. **Biophys. J.**, v. 65, n. 1, p. 409-13, 1993.
- TJELLE, T. E. *et al.* A novel electroporation device for gene delivery in large animals and humans. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4667-70, 2006.
- TOUMI, H. *et al.* Rapid intravascular injection into limb skeletal muscle: a damage assessment study. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 1, p. 229-36, 2006.
- TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 509-44, 1998.
- VICAT, J. M. *et al.* Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. **Hum. Gene Ther.**, v. 11, n. 6, p. 909-16, 2000.
- VILQUIN, J. T. *et al.* Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. **Gene Ther.**, v. 8, n. 14, p. 1097-107, 2001.
- WALTHER, W. *et al.* Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer. **Mol. Biotechnol.**, v. 21, n. 2, p. 105-15, 2002.
- WANG, X. D. *et al.* A comprehensive study of optimal conditions for naked plasmid DNA transfer into skeletal muscle by electroporation. **J. Gene Med.**, v. 7, n. 9, p. 1235-45, 2005.
- WOLFF, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, n. 4949 Pt 1, p. 1465-8, 1990.
- YAMASHITA, Y. *et al.* In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation. **Hum. Gene Ther.**, v. 13, n. 17, p. 2079-84, 2002.
- ZERBIB, D. *et al.* Electric field mediated transformation: isolation and characterization of a TK+ subclone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 129, n. 3, p. 611-8, 1985.

ZHANG, G. *et al.* Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. **Gene Ther.**, v. 11, n. 8, p. 675-82, 2004.