



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ALTOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO DE CAMUNDONGO EM QUERATINÓCITOS
HUMANOS VISANDO A OBTENÇÃO DE UM MODELO
ANIMAL DE TERAPIA GÊNICA**

CRISTIANE WANDERLEY ROSAURO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Cibele Nunes Peroni**

**São Paulo
2003**

Este trabalho é dedicado
com amor ao meu marido,
Estevão.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Altos níveis de expressão de hormônio de crescimento de
camundongo em queratinócitos humanos visando a
obtenção de um modelo animal de terapia gênica**

CRISTIANE WANDERLEY ROSAURO



Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:

Dra. Cibele Nunes Peroni

São Paulo

2003

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu marido que foi meu grande suporte emocional e profissional, mostrando ter uma capacidade infinita de produzir frases de incentivo.

À Dra. Cibele Nunes Peroni, pela orientação deste projeto, pela importante contribuição no meu desenvolvimento científico e pela amizade.

Aos meus pais, que me deram estrutura para que eu desenvolvesse qualquer trabalho, e a quem devo todo amor e admiração.

Aos meus irmãos, Augusto, Ricardo, Marcelo e Renan por estarem sempre presentes e significarem tanto amor na minha vida.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela oportunidade e confiança.

À Dra. Maria Teresa Ribela pela paciência e indispensável ajuda.

Ao João Ezequiel de Oliveira (Johnny) pelas incontáveis ajudas no decorrer de todo projeto.

Ao José Maria de Sousa pelo constante otimismo.

Ao Dr. Carlos Soares pelo interesse e colaboração.

À Dra. Mônica Mathor e à Dra. Maria Helena Bellini Marumo pelo conhecimento transmitido.

À Rosângela Arkaten, à Sueli Tavares, ao Antônio Carlos Junqueira, ao Cícero dos Santos; pela ajuda e disposição e a todos os funcionários e colegas que estiveram ao meu lado.

Aos colegas Fernanda Mendonça, Fernanda Isilda, Eric e Patrick pelas conversas, risadas, companhia e amizade.

Aos amigos que carregou para a vida:

- Paula Beatriz Munhoz Soares, que foi a responsável pela minha iniciação no mestrado, e suportou esta responsabilidade em momentos difíceis.
- Letícia Bellaver, que foi a grande companheira de mestrado compartilhando todos os sentimentos que a ciência nos desperta.
- Jane de Oliveira, que sem saber ajudou com sua tranquilidade e grande amizade.
- Andréa Leão, a quem cito pela amizade.
- Gabriel Feltran pelo carinho.
- Alexandre Mathias e Marcos Bottini que são também meus irmãos.

A todos professores das disciplinas de pós-graduação.

Ao IPEN-CNEN/SP pela utilização das dependências e recursos dos laboratórios.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e de recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Altos níveis de expressão de hormônio de crescimento de camundongo em queratinócitos humanos visando a obtenção de um modelo animal de terapia gênica

Cristiane Wanderley Rosauo

Resumo

A terapia gênica cutânea é considerada um método potencialmente atrativo para a correção de deficiências protéicas, uma vez que queratinócitos humanos modificados geneticamente podem produzir e secretar produtos gênicos com ação sistêmica. Neste trabalho foi estabelecida uma estratégia de terapia gênica *ex vivo*, utilizando queratinócitos humanos primários transduzidos com um eficiente vetor retroviral (LXSN) contendo o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH). Esta estratégia será considerada, especialmente, para futuros implantes em camundongos anões imunodeficientes (modelo homólogo).

O vetor LmGHSN foi introduzido em uma linhagem de células empacotadoras ecotróficas (GP+E86), e a expressão do mGH (10 ng/mL) foi detectada no meio de cultura mediante utilização de um radioimunoensaio específico. As partículas virais contendo o mGH resultantes desta primeira transfecção foram então utilizadas para a infecção de uma segunda linhagem de células empacotadoras anfotróficas (GP+ENV+AM12) e 36 clones foram isolados mediante seleção com G418. Clones que apresentaram níveis de secreção variando de 22-50 ng mGH/10⁶células.dia e títulos virais entre 10⁵-10⁶ ufc/mL foram escolhidos para a transdução de queratinócitos humanos primários. O estabelecimento de métodos eficientes de transdução gênica, baseados no uso de protocolos envolvendo coculturas com adição de polibreno e seleção com G418, resultaram na obtenção de níveis estáveis de secreção de até 11 µg mGH/10⁶células.dia pelos queratinócitos modificados. Este valor é maior que o obtido previamente num modelo utilizando o GH humano (hGH) em nosso laboratório e representa o mais alto nível de expressão de uma forma de GH já reportado para estas células.

O epitélio formado por estes queratinócitos geneticamente modificados apresentou, porém, uma queda de expressão da ordem de 94% quando as células foram destacadas da placa de cultura para serem implantadas nos camundongos. Assim, as possíveis razões para esta perda de expressão e a utilização de outra metodologia de implante, com a construção de uma cultura celular organotípica, estão sendo estudadas.

Em conclusão este trabalho, que pela primeira vez levou à obtenção de queratinócitos capazes de secretar mGH, contribuiu para a melhora de alguns aspectos fundamentais do nosso sistema, tais como a extração e cultura de queratinócitos, a expressão *in vitro* e a metodologia de implante. Estamos conscientes de que para a obtenção de níveis de secreção altos e duradouros de GH *in vivo* pelos queratinócitos transduzidos é necessário um controle rigoroso de todos os fatores envolvidos.

High-level expression of mouse growth hormone by transduced primary human keratinocytes in order to obtain an animal model of gene therapy

Cristiane Wanderley Rosauo

Abstract

Cutaneous gene therapy is considered a potentially attractive method to correct protein deficiencies, since genetically modified human keratinocytes can produce and secrete gene products with systemic action. We have set up an *ex vivo* gene therapy strategy using primary human keratinocytes transduced with an efficient retroviral vector (LXSN) encoding for the mouse growth hormone gene (mGH). This especially considering that the grafting will be carried out in immunodeficient dwarf mice (homologous model).

After transfection of the GP + E86 ecotropic packaging cell line with the vector LmGHSN, the expression of mGH (10 ng/mL) was detected in the culture medium by a specific radioimmunoassay. Viral particles containing the mGH generated by this first cell line were then used to infect the amphotropic packaging cell line GP+ENV+AM12 and 36 clones were isolated by G418 selection. Clones presenting a secretion level ranging from 22-50 ng mGH/10⁶ cells.day and a viral titer of 10⁵ - 10⁶ cfu/mL were chosen to transduce primary human keratinocytes. The setting up of efficient gene transduction methods, based on the use of coculture protocols utilizing polybrene and G418 selection, provided a stable *in vitro* secretion level of up to 11 µg mGH/10⁶ cells.day by the modified keratinocytes. This value is higher than that previously obtained for the hGH model in our laboratory and represents the highest expression level of a form of GH ever reported for this type of cells.

The epidermal sheet made with these genetically modified keratinocytes, however, demonstrated a secretion decrease of approximately 94% when the cells were detached from the culture plate, in order to be implanted into the mice. Thus the possible reasons for this expression loss and the use of another grafting methodology, with the construction of an organotypic raft culture, are being studied.

In conclusion this work, that for the first time described the preparation of mGH-secreting keratinocytes, has contributed to the improvement of some fundamental aspects of our system, such as extraction and culture of keratinocytes, *in vitro* expression and grafting methodology. We are aware that in order to get a high and sustained GH secretion *in vivo* by transduced keratinocytes we need to exercise a more careful control on all factors involved.

1	Introdução.....	1
2	Objetivos	4
3	Revisão bibliográfica	5
3.1	Situação atual da terapia gênica.....	6
3.2	Transporte de DNA	8
3.2.1	Vetores retrovirais.....	10
3.2.2	Vetores adenovirais	13
3.2.3	Vetores adenovírus-associados	14
3.3	Seleção de células transduzidas.....	14
3.4	Terapia cutânea	16
3.5	Células alvo	17
3.5.1	Fibroblastos.....	18
3.5.2	Queratinócitos	18
3.5.3	Células tronco epidérmicas.....	22
3.6	Modelos animais.....	23
3.7	Desafios e perspectivas futuras	25
4	Materiais.....	28
4.1	Principais equipamentos e acessórios	28
4.2	Principais reagentes e acessórios para biologia molecular	29
4.3	Preparações padrão, antissoros e reagentes para imunoenaios	30
4.4	Principais reagentes e acessórios para cultura celular.....	31
4.5	Cepa de E. coli utilizada	32
4.6	Plasmídeo utilizado	33
4.7	Vetor retroviral utilizado.....	33

4.8	Linhagens celulares utilizadas	34
4.8.1	Células de empacotamento.....	34
4.8.1.1	Fibroblastos GP+E86	34
4.8.1.2	Fibroblastos GP+ENV+AM12.....	35
4.8.2	Células utilizadas para ensaio de titulação viral e como camada de sustentação: fibroblastos NIH-3T3 e NIH-3T3-J2	35
4.8.3	Células alvo: queratinócitos humanos	35
5	Métodos	36
5.1	Amplificação dos plasmídeos	36
5.1.1	Transformação de bactérias E. coli	36
5.1.2	Condições de crescimento	36
5.1.3	Extração e purificação dos plasmídeos	36
5.1.4	Remoção de RNA	36
5.1.5	Separação e purificação dos fragmentos de DNA.....	37
5.2	Reações de digestão e de ligação de fragmentos de DNA.....	37
5.3	Cultura de fibroblastos	37
5.4	Extração de queratinócitos humanos	37
5.5	Cultura de queratinócitos humanos	39
5.6	Obtenção de células produtoras do vetor retroviral pLmGHSN	39
5.6.1	Transfecção transiente das células empacotadoras ecotróficas GP+E8639	
5.6.2	Infecção permanente das células empacotadoras anfitriãs GP+ENV+AM12.....	42
5.7	Determinação da concentração de geneticina (G418) para seleção de células empacotadoras anfitriãs GP+ENV+AM12 infectadas	43
5.8	Seleção de células infectadas	43
5.9	Titulação	43
5.10	Transdução de queratinócitos humanos	44
5.10.1	Método 1 – contato célula-célula	44

5.10.2	Método 2 – sobrenadante+polibreno.....	44
5.10.3	Método 3 – contato célula-célula+polibreno.....	45
5.11	Seleção de queratinócitos transduzidos com o cDNA do mGH.....	45
5.12	Avaliação da estabilidade de transdução dos queratinócitos.....	46
5.13	Preparação de epitélio de queratinócitos transduzidos e análise de expressão “in vitro”.....	46
5.14	Determinação da meia-vida circulatória do hGH e do mGH no camundongo normal (C57BL) e anão (little/little).....	47
5.15	Análise da expressão protéica.....	47
5.15.1	Radioimunoensaio (RIA).....	47
5.15.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	48
5.15.3	Western blotting.....	48
5.15.4	Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC).	49
6	Resultados.....	50
6.1	Obtenção do vetor de expressão retroviral contendo o cDNA do mGH.....	50
6.1.1	Isolamento do cDNA do hormônio de crescimento de camundongo....	50
6.1.2	Linearização do vetor pLXSN.....	50
6.1.3	Ligação do cDNA do mGH ao pLXSN.....	50
6.1.4	Verificação da posição correta do inserto.....	53
6.2	Obtenção de células produtoras de partículas virais contendo o vetor pLmGHSN.....	54
6.2.1	Determinação da concentração ideal de geneticina para seleção de células infectadas.....	54
6.2.2	Obtenção de células ecotróficas GP+E86 produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN.....	55
6.2.3	Obtenção de células anfotróficas GP+ENV+AM12 produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN.....	56
6.3	Obtenção de cultura de queratinócitos humanos.....	59

Sumário

6.4	Transdução de queratinócitos humanos	60
6.5	Seleção de queratinócitos transduzidos	63
6.6	Análise comparativa da expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos utilizando dois métodos de transdução, e seleção com G418	64
6.7	Avaliação da estabilidade de expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos	66
6.8	Análise do mGH expresso por epitélio modificado "in vitro"	68
6.9	Determinação da meia-vida circulatória do hGH e do mGH no camundongo normal (C57BL) e anão (little/little)	72
6.10	Caracterização do mGH expresso pelos queratinócitos transduzidos	73
6.10.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blotting.....	73
6.10.2	Análise em HPSEC associada a RIA.....	74
7	Discussão	76
8	Conclusões	87
9	Referências bibliográficas	88

1 Introdução

A terapia gênica pode ser definida basicamente como o tratamento de doenças humanas com base na transferência de material genético para as células de um indivíduo, que resulte em um benefício terapêutico. Esses genes podem ser introduzidos *in vitro* em células removidas do indivíduo, que são posteriormente reimplantadas no paciente (terapia gênica *ex vivo*) ou podem ser introduzidos diretamente no paciente (terapia gênica *in vivo*).

O fácil acesso da pele como alvo terapêutico fornece um grande potencial para o desenvolvimento de protocolos de terapia gênica. A epiderme é um epitélio estratificado cuja principal célula, o queratinócito, pode ser serialmente propagada em cultura. Em condições apropriadas, é possível expandir uma biópsia de 1 cm² de pele para 1 m² após 3 semanas (Morgan, 1987). O epitélio cultivado pode ser, então, destacado da superfície da placa de cultura e implantado no organismo receptor.

Os queratinócitos são capazes de secretar proteínas biologicamente ativas após transferência gênica, tais como o fator IX da coagulação (Fenjves, 1996; Page, 1997; White, 1998), a interleucina 6 (Mathor, 1994; Mathor, 1996), a apolipoproteína E (Fenjves, 1994b) e respondem a uma larga gama de fatores reguladores de crescimento. Queratinócitos primários transformados com o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) já foram utilizados em alguns experimentos (Morgan, 1987; Miller, 1990b; Teumer, 1990; Jensen, 1994; Vogt, 1994; Wang, 1997). O nosso grupo de pesquisa também possui experiência na transdução de queratinócitos humanos primários com o gene de hGH. Primeiramente, com a utilização de um vetor retroviral sob o controle do promotor da metalotioneína, foi obtida uma expressão *in vitro* da ordem de 340 ng hGH/10⁶ células.dia, um valor que podia ser aumentado 10 vezes com a ativação do promotor com zinco. Porém, após implante dos

queratinócitos transduzidos em camundongos atímicos, os níveis circulantes de hGH foram indetectáveis (Mathor, 1994). Em um trabalho subsequente foi, então, utilizado um vetor retroviral mais potente, que possui o promotor LTR (*Long Terminal Repeat*) isolado do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV). Este sistema permitiu a obtenção de níveis de secreção *in vitro* acima de 7 µg hGH/10⁶células.dia. Novamente foram detectados níveis relativamente baixos de hormônio na circulação de camundongos anões imunodeficientes (*little/scid*), que variaram entre 0,2 e 0,3 ng hGH/mL durante 12 dias de ensaio com um pico de 1,5 ng hGH/mL após 4 horas do implante, com obtenção de ganho de peso significativa (Bellini, 2001).

Vetores retrovirais fornecem um método eficiente para a transferência gênica em queratinócitos. O sistema necessário para essa transferência pode ser dividido em dois componentes: primeiro, o próprio vetor que, genericamente, não codifica proteínas virais; e segundo, as linhagens de células empacotadoras que fornecem as proteínas virais necessárias para a transferência do vetor. Melhoramentos nesse sistema têm levado a grandes aumentos de eficiência de transferência gênica, aproximando de 100% mesmo em culturas primárias (Miller, 1989). No presente trabalho se usa o vetor retroviral porque é um vetor integrativo e possibilita uma transdução permanente. Os vetores retrovirais têm propriedades que os tornam uma ferramenta poderosa nos estudos de transferência gênica: estão naturalmente envolvidos na transferência gênica do seu RNA para células hospedeiras (Miller, 1989). Utilizou-se assim o pLXSN que é um vetor derivado do vírus da leucemia murina de Moloney, do tipo defectivo, no qual houve uma substituição dos genes estruturais de retrovírus *gag* (gene que codifica as proteínas que constituem o corpo viral), *pol* (gene que codifica a transcriptase reversa) e *env* (gene que codifica as proteínas do envelope) pelo gene que codifica a informação a ser transferida, no caso, o gene do mGH. Este vetor mantém a região ψ (*psi*) que é necessária para o encapsideamento do material genético (Miller, 1989).

Introdução

A utilização de um gene murino está relacionada à construção de um modelo animal de terapia gênica homólogo, no qual os efeitos de espécie-especificidade sejam minimizados com contatante prolongamento do efeito terapêutico; visualizado pelo aumento dos níveis de hormônio circulante e alteração fenotípica (ganho de peso).

Com base nas considerações acima, o presente trabalho apresenta um modelo experimental baseado na utilização de um vetor retroviral contendo o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) para transdução de queratinócitos humanos primários, visando estudos *in vivo* de terapia gênica.

2 *Objetivos*

A finalidade deste trabalho é o estabelecimento de metodologias *in vitro*, que contribuam no desenvolvimento de um modelo de terapia gênica cutânea, para o estudo do tratamento de doenças sistêmicas. Dessa maneira, os seguintes objetivos foram focados:

- Construção de um vetor retroviral com o cDNA do hormônio de crescimento de camundongo (mGH), sob controle do promotor *Long Terminal Repeat*;
- Obtenção de cultura de queratinócitos humanos primários duradoura e estável;
- Obtenção de queratinócitos humanos geneticamente modificados que expressem o gene murino do hormônio de crescimento;
- Obtenção de altos níveis de expressão *in vitro* da proteína recombinante pelas células geneticamente modificadas;
- Caracterização da proteína recombinante expressa;
- Determinação e comparação da meia-vida circulatória do hGH e do mGH no camundongo anão (*little/little*).

3 Revisão bibliográfica

Terapia gênica é o tratamento de doenças baseado na transferência de material genético. Em sua forma mais simples, a terapia gênica consiste na inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos, para substituir ou complementar esses genes causadores de doenças. Considera-se a terapia gênica como uma progressão natural na aplicação da ciência biomédica representando um extraordinário potencial no tratamento de doenças humanas até hoje consideradas incuráveis por métodos convencionais (Dani, 1998).

A maioria das deficiências de proteínas sistêmicas é atualmente tratada por múltiplas injeções do polipeptídeo deficiente. Procedimentos de administração que eliminassem esse desconforto por parte do paciente são altamente desejáveis. A expressão de proteínas recombinantes a partir de células geneticamente modificadas oferece um sistema atrativo de terapia para o tratamento permanente de doenças sistêmicas, como o nanismo por hormônio de crescimento, coagulopatias por fatores de coagulação e o diabetes Melitus por insulina (Alitalo, 1982; Taichman, 1999). Além disso, a produção de terapêuticos dentro do organismo humano eliminaria a necessidade dos processos de purificação, controle de qualidade e o perigo da administração de contaminantes tóxicos. Uma das características deste tipo de terapia é de permitir, pelo menos potencialmente, a liberação de um produto ativo de uma maneira similar à sua liberação natural, *in vivo*.

O crescente interesse pelo campo de pesquisa relacionada à terapia gênica humana deve-se ao fato da sua importância não somente objetivando o tratamento de doenças genéticas clássicas, como também à sua aplicação em outras enfermidades graves adquiridas (Morgan, 1993). De fato, a maioria das tentativas clínicas de terapia gênica atualmente em curso é para o tratamento de doenças adquiridas, como AIDS,

neoplasias malignas e doenças cardiovasculares, mais do que para doenças hereditárias (Dani, 1998). Verifica-se nos últimos anos uma rápida expansão do número de protocolos para algumas doenças, tais como deficiência de adenosina deaminase (*ADA*scid) (Blaese, 1995; Kohn, 1998; Cavazzana-Calvo, 2000) e fibrose cística (Boucher, 1994; Fisher, 1996) que direcionam esforços ao desenvolvimento de terapias gênicas com resultados clínicos efetivos, com perspectivas de que este tipo de tratamento se torne uma realidade prática ainda no início deste século (Kay, 1997) .

Em alguns protocolos, a tecnologia da transferência gênica vem sendo usada para alterar fenotipicamente uma célula de tal modo a torná-la antigênica e assim desencadear uma resposta imunitária. De maneira análoga, um gene estranho pode ser inserido em uma célula para servir como um marcador genotípico ou fenotípico podendo ser usado em protocolos de marcação gênica. O panorama atual indica que a terapia gênica não se limita a possibilidades de substituir ou corrigir genes defeituosos, ou eliminar seletivamente células marcadas. Um espectro terapêutico muito mais amplo se apresenta à medida que novos sistemas são desenvolvidos para permitir a liberação de proteínas terapêuticas, tais como hormônios, citocinas, anticorpos, antígenos ou novas proteínas recombinantes (Dani, 1998).

O conceito de que a transferência de genes deve ser usada para o tratamento de doenças é fundamentado nos notáveis avanços da tecnologia de DNA recombinante nas últimas duas décadas (Orkin, 1995).

3.1 Situação atual da terapia gênica

Durante os últimos 10 anos, a credibilidade da terapia gênica tem flutuado devido a uma falta de balanço entre as expectativas e os resultados atingidos. Após a morte de um paciente na Pensilvânia em 1999 (Zallen, 2000), a terapia gênica recuperou

credibilidade devido ao tratamento bem sucedido de cinco pacientes com Imunodeficiência Severa Combinada ligada ao cromossomo X na França, pela reintrodução de linfócitos T transduzidos com uma cópia normal do gene da adenosina deaminase (ADA) em pacientes que apresentavam deficiência do gene (Cavazzana-Calvo, 2000).

Segundo *The Journal of Gene Medicine Website* (www.wiley.co.uk/genmed, atualizado em junho de 2003), foram identificados no mundo um total de 636 ensaios clínicos de terapia gênica, em andamento. Esses ensaios estão sendo desenvolvidos principalmente nos Estados Unidos que concentram mais de 79% dos protocolos em fase I, II e III. Na TAB. 3.1, estão apresentados os números de protocolos em desenvolvimento em diferentes regiões do mundo. Dentre os países da Europa, os que mais se destacam são os pertencentes ao Reino Unido (6,8%), a França (2,4%), a Alemanha (1,6%), a Suécia (1,3%) e a Itália (1,1%).

TABELA 3.1: Distribuição dos protocolos e pacientes de ensaios clínicos de terapia gênica em fase I, II e III no mundo.

Região	Protocolos		Pacientes	
	Número	%	Número	%
América	516	81,1	2210	63,2
Europa	103	16,2	928	26,5
Ásia	9	1,4	32	0,9
Austrália	3	0,5	13	0,4
África	1	0,2	15	0,4
Multicontinente	4	0,6	298	8,5
Total	636	100	3496	100

Atualmente, 66% dos protocolos encontram-se em fase I (teste com foco em segurança), 21% em transição entre as fases I e II, 11,5% na fase II (foco em efetividade), 0,8% em transição entre as fases II e III, e 0,6 % em fase III (teste em maior escala). Mais da metade dos protocolos está relacionada ao tratamento de

câncer (63%). Doenças monogênicas participam com 12% dos protocolos, enquanto doenças vasculares, genes marcados e AIDS participam com 8%, 7% e 6% respectivamente. Na maioria dos protocolos, verificamos uma predominância do uso de vetores virais nos ensaios clínicos. Na TAB. 3.2 encontra-se a estatística referente aos principais vetores utilizados.

TABELA 3.2: Estatística dos principais vetores utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica em fase I, II e III, e de pacientes submetidos a estes protocolos.

Vetor	Protocolos		Pacientes	
	Número	%	Número	%
Retrovírus	217	34,1	1757	50,3
Adenovírus	171	26,9	644	18,4
Lipofecção	77	12,1	619	17,7
<i>Naked DNA</i>	70	11,0	123	3,5
Outros	70	10,9	261	7,5
Vírus adeno-associado	15	2,4	36	1,0
<i>Gene gun</i>	5	0,8	35	1,0
<i>Herpes simplex virus</i>	5	0,8	21	0,6
Total	636	100	3496	100

Assim, entre os vetores virais, os mais usados para propósito clínico são os retrovírus, os adenovírus, e os vírus adeno-associados, sendo que cada um deles apresenta vantagens e desvantagens que os adaptam melhor a uma determinada aplicação clínica (Stone, 2000).

3.2 Transporte de DNA

Genericamente há dois diferentes métodos de transporte de DNA para a célula. A terapia gênica *ex vivo* envolve a remoção de células do paciente para manipulação *in vitro*; as células modificadas são então transferidas de volta para o paciente. A terapia *ex vivo* assegura, portanto, que o gene transferido seja limitado a células de um tecido ou órgão em particular (Orkin, 1995). No caso da terapia gênica *in vivo*, o DNA

é injetado diretamente no ser humano. Pelo fato das experiências clínicas serem ainda limitadas, não é possível excluir efeitos colaterais de longo prazo na terapia *in vivo*. Pode-se dizer que múltiplos eventos de integração resultantes das repetidas administrações *in vivo* de grandes doses de retrovírus representam um risco para a transformação cancerígena. Dessa forma, uma variação deste método é desejada para que o DNA injetado *in vivo* se integre somente a células alvo (Grobhans, 2000).

A terapia gênica tem como principais desafios dois passos críticos: o transporte de material genético para células apropriadas e sua subsequente manutenção e expressão. A maneira mais simples de transferir genes para células e tecidos é por meio da inoculação de DNA puro, com técnicas de microinjeção e eletroporação. Métodos mais elaborados e mais eficientes incluem a administração de DNA encapsulado (lipossomos); ou mediante utilização de 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 (Dani, 1998).

Muitos pesquisadores têm se concentrado no desenvolvimento de vetores para transferência gênica. Vários tipos de vírus estão sendo estudados com este propósito, onde se percebe uma tendência para a utilização dos retrovírus. Outros tipos de vírus, incluindo adenovírus (AV), vírus adeno-associado (AAV), vírus do herpes e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) estão também sendo estudados para o desenvolvimento de vetores.

Basicamente seis fatores são procurados em um vetor viral de transferência gênica: (1) capacidade de gerar altos títulos; (2) capacidade de carregar maiores quantidades de DNA; (3) capacidade de transduzir células em divisão ou estacionárias; (4) capacidade de integração; (5) falta de antigenicidade; e (6) facilidade de preparar vetores não capazes de se replicar (Ghazizadeh, 2000).

3.2.1 Vetores retrovirais

Na maioria das vezes, os retrovírus são o sistema de escolha, devido às suas características de poder receber, indiferentemente RNA ou DNA, converter RNA em DNA por meio de uma enzima viral específica (transcriptase reversa) e integrar o DNA no cromossomo do hospedeiro, permitindo assim a transmissão da informação genética para as células descendentes (Ghazizadeh, 1998). Outra vantagem é o amplo espectro de espécies animais e tipos de células que eles podem infectar, além de ser um sistema relativamente seguro (Kay, 1997).

Os vetores virais mais empregados em protocolos de terapia gênica são os derivados do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV). Não se tem conhecimento desse vírus causar doenças em humanos, e nenhuma toxicidade foi reportada em aproximadamente 1500 pacientes tratados em vários ensaios clínicos usando vetores baseados nesse vírus (Mc Cormack, 2001).

A biologia básica dos retrovírus é a mais conhecida entre os vetores usados para experimentos de transferência gênica. Genes retrovirais foram extensivamente modificados para garantir que os vetores não se repliquem e para que a recombinação genética seja improvável (Orkin, 1995). Dessa maneira, Miller e colaboradores (Miller, 1989) construíram um grupo de vetores retrovirais, derivados do vírus da leucemia murina de Moloney, com sítios de clonagem únicos para a inserção de cDNAs. Esses retrovírus foram construídos para prevenir a síntese de proteínas das seqüências virais remanescentes e para eliminar a recombinação homóloga com os DNAs virais presentes nas células de empacotamento, o que poderia habilitar o vetor a se multiplicar nas células alvo.

Por meio de técnicas de DNA recombinante, há uma substituição dos genes estruturais de retrovírus (*gag*, *env* e *pol*) pelo gene que codifica a informação a ser transferida.

O que sobra do retrovírus são seus elementos regulatórios: as repetições terminais longas (LTR), que funcionam como sinais de integração do provírus e promotores da transcrição e um sinal de empacotamento, para permitir que o RNA transcrito seja acomodado em uma partícula viral.

Para a produção dos vetores retrovirais contendo o gene de interesse é utilizada uma linhagem celular de empacotamento contendo os genes *gag*, *pol* e *env*. Portanto, estas células contêm as informações ausentes no vetor retroviral defectivo em uma sequência *helper virus* que expressa em "trans", permitindo que se complete o ciclo viral. Os vetores são produzidos em altos títulos nas células de empacotamento e a seguir purificados e injetados no paciente (terapia gênica *in vivo*) ou postos em contato com células colhidas do paciente e mantidas em condições de cultivo celular (terapia gênica *ex vivo*). As partículas virais formadas têm a habilidade de se ligar às células-alvo transferindo seu material genético para o interior da célula, transcrever seu RNA na forma de DNA (atividade da enzima transcriptase reversa), e os genes de interesse se integram estavelmente em um cromossomo da célula como resultado da presença das sequências regulatórias retrovirais remanescentes. Uma vez integrado, o gene inserido pode ser expresso para produzir a proteína terapêutica desejada. O vetor retroviral não é competente para a replicação (é defectivo), e por isso não é capaz de produzir mais vírus competentes dentro da célula alvo. Portanto, o vetor age como um agente final de transferência gênica, deixando uma cópia de sua sequência no genoma da célula-alvo (Dani, 1998).

Devido à natureza defectiva do vetor retroviral, a transferência de DNA para a célula alvo é chamada transdução, para diferenciar do termo infecção que é reservado a vírus que têm competência de se multiplicar nas células hospedeiras (Morgan, 1993).

O risco de produzir partículas retrovirais competentes para replicação a partir da introdução do vetor em células empacotadoras, foi reduzido, ainda, com a introdução

dos genes gag-pol e env em cassetes de expressão separados nestas células. Portanto, há adicionalmente minimização de seqüências virais na obtenção de células empacotadoras.

Considera-se a maior desvantagem dos vetores retrovirais defectivos o fato deles necessitarem que as células alvo estejam em divisão no momento da infecção para que essa infecção e conseqüente integração sejam bem sucedidas. Em células estacionárias, a eficiência de transferência gênica usando esses vetores é 100 vezes menor que em células em divisão (Miller, 1990b). Embora sejam eficientes na transdução de células em cultura, a maioria das células em um organismo são quiescentes em algum momento, fazendo com que esses vetores sejam menos úteis para terapia gênica *in vivo* (Kay, 1997).

Outro problema discutido é seu potencial de causar dano genético devido à sua integração randômica no genoma hospedeiro. Essa forma aleatória dificulta estudos de expressão regulada. Entretanto, essa característica de integração no genoma faz do retrovírus o vetor mais provável para a terapia gênica, já que promove integração de material genético eficiente e estável (Orkin, 1995).

Estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de técnicas que direcionem a integração do DNA transportado por estes vetores em sítios específicos do cromossomo humano.

A recombinação homóloga de seqüências de DNA em um cromossomo com a introdução de novas seqüências fornece meios para alterar sistematicamente o genoma de mamíferos. Uma alteração desejada seria introduzida primeiramente em uma seqüência de DNA clonada, e a transferência gênica levaria a uma alteração direcionada do genoma, podendo ser útil tanto para correção como para mutação do loco cromossomal desejado.

Thomas e colaboradores (Thomas, 1987) demonstraram a inativação de um loco específico no genoma de camundongo (*HPTR* - gene da hipoxantina fosforibosil transferase), usando técnicas de recombinação homóloga para a integração do transgene em células embrionárias de camundongo transfectadas. Tal procedimento pode ser adaptado para outros genes.

Recentemente, Laufs e colaboradores (Laufs, 2003), analisando o sequenciamento de sítios de integração após transdução de células humanas progenitoras de medula óssea, verificaram que essa integração ocorreu preferencialmente, com frequência significativamente maior, nos cromossomos 17 e 19 e em regiões específicas dos cromossomos 6, 13 e 16, revelando que uma integração de vetor retroviral pode não ser totalmente randômica.

O entendimento de técnicas de direcionamento de DNA nas células alvo deve reduzir o risco de causar danos genéticos.

3.2.2 Vetores adenovirais

A segunda classe de vetores utilizada na terapia gênica é a dos adenovírus, que possuem uma ampla gama de hospedeiros e podem infectar células em divisão ou estacionárias. Tais vetores podem ser utilizados tanto no método *in vivo* quanto no método *ex vivo* de terapia gênica, e apresentam alta capacidade de produção de partículas virais (até 10^{11} ufc/mL).

Os vetores adenovirais mais comuns são explorados para uso em ensaios clínicos de fibrose cística e câncer (Kay, 1997). Entretanto, a utilização dos adenovírus apresenta algumas desvantagens: o DNA não se integra aos cromossomos, mantendo-se episomal e não se replica. Dessa maneira, a divisão celular leva à eventual perda do vetor nas células descendentes conferindo um tratamento transiente (Morgan, 1993).

Além disso, apresentam seqüências antigênicas que podem provocar uma resposta tecidual e humoral no paciente (Verma, 1997).

3.2.3 Vetores adenovírus-associados

São vetores apatogênicos e infectam células em divisão ou estacionárias. Ao contrário dos adenovírus, não apresentam seqüências que codificam proteínas virais imunogênicas, evitando respostas indesejáveis. Os adenovírus-associados (AAV) são integrativos e, portanto, produzem uma expressão estável do transgene. Sua grande vantagem é o fato de apresentar certa especificidade ao se integrar no genoma. Tem sido demonstrado que o AAV se integra preferencialmente em uma pequena região do braço longo do cromossomo 19, e, se os mecanismos bioquímicos responsáveis por essa integração separada forem isolados do AAV, pode ser possível combiná-los com sistemas de transferência gênica de alta eficiência (Morgan, 1993).

O uso de AAV tem produzido concentrações terapêuticas do fator de coagulação IX em camundongos sem apresentar toxicidade por pelo menos nove meses após transporte *in vivo* (Herzog, 1997). Até o momento, entretanto, os estudos realizados consideram que a produção de partículas virais com a utilização destes vetores não é eficiente, pois, embora produzam um alto número de partículas, pequena porcentagem tem poder de infecção. Outra desvantagem desses vetores é que sua utilização é restrita, pois só podem acomodar segmentos de DNA de no máximo 3,5 a 4 kb (Kay, 1997).

3.3 Seleção de células transduzidas

Embora a expressão do gene transferido seja essencial para o sucesso da terapia gênica, altas expressões em células somáticas e estabilidade de expressão não têm sido atingidas por razões ainda não bem esclarecidas, sendo atribuídas por vezes a algum mecanismo celular de repressão de genes virais. A consequência disto para

ensaios em humanos é incerta. Em muitos casos, a eficiência da transferência de genes é tão baixa que pesquisadores precisam usar métodos extremamente sensíveis como *reverse transcriptase PCR* para a avaliação da expressão *in vivo* (Orkin, 1995). Uma solução para aumentar a expressão de células transduzidas seria a seleção de células que expressem o gene de interesse e um gene de seleção que podem estar ligados em um vetor bicistrônico (Pfutzner, 1999). Assim, introdução de marcadores de resistência, e subsequente uso da droga correspondente, pode fornecer meios de expandir preferencialmente ou exclusivamente populações de células alvo transduzidas.

Há uma grande variedade de genes que conferem características para seleção. Inclui-se resistência a vários agentes como geneticina (G418), higromicina, metotrexato, puromicina, ácido micofenólico, xantina e histidinol. O gene da aminoglicosídeo fosfotransferase (usualmente referido como *neo^R*) confere resistência à G418, um análogo da neomicina, e tem sido muito útil para seleção de células transduzidas nos protocolos de terapia gênica com queratinócitos. Segundo Fenjves (Fenjves, 1994a), a seleção de queratinócitos requer várias provisões. Primeiro, a seleção deve ser iniciada após as células transduzidas completarem dois ciclos de replicação para permitir a integração do novo gene introduzido. Segundo, é aconselhável que a seleção se inicie antes que as colônias tenham 10 células, caso contrário as células transduzidas resistentes ligadas por junções de desmossomos a células sensíveis podem se tornar desalojadas quando estas se tornarem necróticas e escamarem no meio.

Procurando aumentar a expressão de queratinócitos transduzidos, Pfutzner e colaboradores (Pfutzner, 1999) utilizaram o gene de resistência a multidrogas (MDR) como gene de seleção que confere resistência a uma variedade de antimitóticos como a colchicina. O uso da colchicina aumentou a porcentagem de queratinócitos

expressando MDR para quase 100% em cultura celular, e estas células foram capazes de formar uma epiderme modificada estratificada.

O tratamento com agentes de seleção deve assegurar a sobrevivência e proliferação somente de células que expressem o gene de seleção, e consequentemente aumentando a porcentagem de células que expressem o gene terapêutico ligado ao gene de seleção.

3.4 Terapia cutânea

A pele consiste de várias camadas e foi um dos primeiros alvos para experimentos de terapia gênica. A camada mais superficial, a epiderme, é formada por um epitélio estratificado escamoso. Melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e principalmente queratinócitos estão presentes na epiderme. A célula mais diferenciada é o corneócito, que é constantemente escamado da pele, gerando uma necessidade de regeneração que faz com que o tecido seja dependente de uma população de células tronco na camada germinativa (camada basal) (Barrandon, 1987). Dessa forma, a camada basal da epiderme contém uma pequena porcentagem de células indiferenciadas com uma taxa proliferativa relativamente baixa. Essas células são chamadas de células tronco (*stem cells*) e dão origem a uma linhagem pouco diferenciada com alta taxa proliferativa - células amplificadoras (*transient amplifying cells*). A diferenciação em células especializadas acontece a partir destas últimas quando são produzidas as diferentes células da epiderme, como os queratinócitos e os melanócitos. Diferentemente dos queratinócitos e das células amplificadoras que, com a diferenciação, tornam-se células senis e morrem, as células tronco são auto-renováveis e continuam a se proliferar durante o tempo de vida da epiderme. Isso implica que qualquer tratamento genético na pele deva ser direcionado à modificação do genoma de células tronco (Dunnwald, 2001).

Para a terapia gênica, comparada com outros tecidos, a pele oferece a vantagem de ser facilmente acessível para manipulações. As maiores populações de células que compõem a pele podem ser isoladas de um doador, expandidas *in vitro* e enxertadas de volta no paciente. Em particular, queratinócitos mantendo potencial proliferativo e de diferenciação podem crescer em cultura e serem transduzidos *ex vivo*. Isto permite a reconstituição artificial de transplantes epiteliais com técnicas atualmente utilizadas para tratamento de queimados. Além disso, o epitélio modificado pode ser removido se o fim do tratamento é desejado (De Luca, 1989; Pellegrini, 1998).

A pele é ainda o órgão ideal para aplicação de terapia gênica *in vivo*. Nesse contexto a reversão da hiperproliferação epidermal em psoríases foi recentemente obtida *in vitro* e *in vivo* pelo uso de oligonucleotídeos transportados a queratinócitos humanos, causando inibição da expressão do receptor do fator I de crescimento *insulin-like* (Wraight, 2000). O fato da epiderme estar em constante renovação exige que, para terapias gênicas de longa duração, a transferência gênica atinja células tronco da camada basal da epiderme. Estas células podem assegurar a transmissão e integração do gene para células descendentes durante a renovação da epiderme.

3.5 Células alvo

A terapia gênica pode, em princípio, ser realizada tanto em células da linhagem germinativa quanto da somática. Porém, por razões éticas e práticas, somente as células somáticas são utilizadas, tais como células hematopoiéticas, hepáticas, musculares, endoteliais vasculares e epiteliais, destacando-se os fibroblastos e os queratinócitos. Dessa maneira a transferência de genes afeta somente indivíduos sob tratamento não sendo transmitida aos indivíduos descendentes.

A escolha da célula usualmente depende da natureza da doença. Em última análise a escolha do tecido alvo depende de considerações como: acesso, eficiência de transferência gênica, modificações na proteína e fatores econômicos.

3.5.1 Fibroblastos

Entre as linhagens celulares mais utilizadas, os fibroblastos estão incluídos devido, principalmente, ao fato de crescerem facilmente em cultura e poderem ser transplantados em diversos locais. A utilização destas células transduzidas com o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) possibilitou a detecção de níveis relativamente altos (0,4 - 10 ng hGH/mL) na corrente sanguínea dos animais que receberam o implante (Tai, 1993; Heartlein, 1994). Porém, Miller e colaboradores (Miller, 1990a) mencionam o fato dos fibroblastos sofrerem várias mudanças em cultura que podem afetar a sua viabilidade em manter o enxerto após o implante.

3.5.2 Queratinócitos

Os queratinócitos constituem a principal população de células da epiderme podendo estar presentes em uma proporção de 85 a 90% do total de células (Pellegrini, 1998). Podem ser seqüencialmente cultivados e sob condições apropriadas de cultura, reconstituem *in vitro* uma lâmina de epitélio transplantável, mantendo as mesmas características de diferenciação e o mesmo padrão de expressão gênica de seus correspondentes *in vivo* (Green, 1979). Estes transplantes têm sido largamente utilizados no lugar da pele danificada de pacientes queimados (De Luca, 1989), pacientes com defeito na mucosa oral, ou reconstrução de partes de órgãos com defeitos congênitos (Romagnoli, 1990).

Queratinócitos são também potencialmente úteis para a produção de fatores ou polipeptídeos biologicamente ativos para liberação sistêmica ou local no tratamento

permanente de disfunções metabólicas hereditárias ou adquiridas. A esse respeito, a pele é um órgão ideal devido à sua grande área secretora e à sua acessibilidade. Um grande número de fatores é normalmente secretado pelos queratinócitos na matriz celular e atinge a corrente sanguínea. Um estudo com cultura de queratinócitos estimou que aproximadamente 70 proteínas são secretadas no meio de cultura (Katz, 1999). Muitos polipeptídeos expressos na epiderme têm uma expressão basal específica e suas seqüências reguladoras e promotoras têm sido amplamente caracterizadas permitindo expressão regulada de genes recombinantes.

Dessa maneira, Wang e colaboradores (Wang, 1997) usaram o promotor queratina 14 (K 14) em seus estudos de expressão celular na terapia gênica. Queratina 14 é uma das proteínas mais expressas pelas células mitoticamente ativas da epiderme. Nesse trabalho foram produzidos camundongos transgênicos quiméricos contendo o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) sob controle do promotor K 14 e foi demonstrado que a atividade desse promotor foi mantida e que o hGH pôde ser produzido pelos queratinócitos, secretado e transportado para a corrente sanguínea com eficiência.

Muitos estudos têm mostrado a secreção celular proveniente da pele, que atinge a corrente sanguínea, mediada por transferência gênica usando protocolos de terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo*. Transferindo *naked DNA* na pele dorsal de ratos, mediante utilização de injeção do vetor de expressão construído para o gene da interleucina humana (phIL-10), Meng e colaboradores (Meng, 1998) puderam demonstrar que a interleucina 10 (IL-10) liberada pelos queratinócitos transduzidos atingem a circulação causando efeito biológico em áreas distantes da pele e por períodos maiores do que os obtidos com injeções diretas da proteína recombinante, demonstrando a possibilidade de tratamento de doenças sistêmicas mediante terapia gênica cutânea.

A construção de um epitélio modificado demonstrou que queratinócitos humanos transduzidos com o gene da apolipoproteína E (apoE) secretaram a proteína recombinante (apoE-HA1) atingindo níveis da ordem de 160 ng/10⁶cel.dia *in vitro*. A apoE é uma proteína de 34 kD que tem um papel importante na regulação do metabolismo do colesterol. Queratinócitos não transduzidos secretam naturalmente cerca de 30 ng/ 10⁶cel.dia de apoE. A produção de enxertos de 40 mm² a partir destes queratinócitos transduzidos e subsequente implantados em camundongos atímicos demonstrou a presença da proteína recombinante no soro destes animais. Após 28 dias do procedimento de implante, detectava-se no soro dos animais 60 a 70 ng apo E-HA1/mL e o enxerto teve um encolhimento ocupando uma área de 7 mm². Com base nestes dados, os autores calcularam que para a obtenção de cerca de 1 µg da apoE-HA1 por mL em humanos, seria necessário um enxerto que ocupasse 2% da superfície da pele de um adulto (340 cm²) (Fenjves, 1994b). Esses resultados demonstraram que proteínas grandes como a apo-E (299 aminoácidos) podem atravessar a barreira epiderme-derme e atingir a corrente sanguínea.

White e colaboradores (White, 1998) verificaram a expressão *in vitro* do fator de coagulação IX por queratinócitos transduzidos, com o uso de vetores retrovirais obtendo 830 ng de fator IX/10⁶ células.dia e após enxerto de epitélio formado por essas células em camundongos (0,1 a 2,7 ng de fator IX/ mL de plasma sanguíneo) por mais de um ano. Embora a concentração do fator no plasma de camundongos tenha sido baixa para ser clinicamente relevante, a imunohistoquímica mostrou que queratinócitos transduzidos estavam presentes em 150 dias após o procedimento cirúrgico. A razão da baixa concentração do fator no plasma foi justificada pelo pequeno tamanho do enxerto implantado no camundongo. Ainda assim, a presença de expressão por um ano sugere que células tronco epidérmicas foram transduzidas e enxertadas. Além disso, pôde-se verificar que a atividade do promotor retroviral não foi inibida *in vivo* por mais de um ano.

Recentemente, foi reportada a correção fenotípica da disfunção metabólica do camundongo *ob/ob* por terapia gênica *ex vivo* (Larcher, 2001). O camundongo *ob/ob* é caracterizado por obesidade, diabetes tipo 2 e infertilidade devido a uma mutação pontual no gene *lep* causando deficiência de leptina (hormônio de 16 kDa secretado por adipócitos, com função na regulação do consumo de alimento). O implante de enxerto produzido *in vitro*, a partir de queratinócitos transduzidos produzindo altos níveis de leptina recombinante, resultou no transporte sistêmico da proteína. Após um e dois dias, a concentração da leptina secretada pelos queratinócitos no soro dos camundongos tratados alcançou níveis de 20 a 40% mais elevados que nos camundongos controle. Após cinco semanas, os camundongos enxertados tinham perdido até 40% de seu peso, alcançando os valores de animais normais. Este quadro persistiu por até 90 dias após o implante, e sua completa reversão foi obtida com a remoção do enxerto, causando queda repentina dos níveis de leptina e aumento acelerado do consumo de alimento.

Assim, percebe-se grandes avanços quanto à expressão de transgenes em cultura de queratinócitos, entretanto a perda da atividade do transgene é comumente observada após transplante dos queratinócitos modificados *ex vivo*. A obtenção de níveis suficientemente altos de proteínas ativas circulantes, e por longo período, continua sendo o maior desafio das técnicas de terapia gênica que visam tratamentos sistêmicos. A perda de expressão do transgene pode ser devido a um grande número de fatores. Os mais citados são o silenciamento do promotor por metilação na célula hospedeira e a falta de transdução de células tronco. Entretanto, desde que recentes estudos encontraram expressão durante longos períodos quando focaram a transdução de células tronco (Kolodka, 1998; White, 1998), o segundo fator tem sido considerado o mais provável. Krueger e colaboradores (Krueger, 1999a) demonstraram que nenhuma perda da expressão do gene *lacZ* ocorreu após 6 semanas de enxerto de pele, em camundongos, produzida com a transdução de queratinócitos imortalizados, sugerindo que a obtenção da sobrevivência celular foi

responsável pelo alcance da expressão estável *in vivo*. O mesmo autor já tinha estudado a perda da expressão do mesmo gene em fibroblastos transduzidos, *in vivo*, durante 16 semanas e concluiu que essa perda é um evento organizado compatível com eventos de apoptose, e ligada à idade celular (Krueger, 1997).

Para uma terapia de sucesso muito deve se estudar a respeito do direcionamento do transgene para células tronco e da possível rejeição da proteína curativa (Spirito, 2001). Em cultura de queratinócitos mista com células tronco que se replicam lentamente e células amplificadoras que se replicam rapidamente, a transdução com vetores retrovirais favorece estas últimas e a expressão do transgene por esta população mascara a baixa taxa de transdução de células tronco.

3.5.3 Células tronco epidérmicas

O processo completo de uma célula tronco até o corneócito não é completamente conhecido, porém muito progresso tem sido feito quanto à compreensão de regulação de queratinócitos. Os queratinócitos sofrem mitose, diferenciação e migram para repor corneócitos escamados e a epiderme humana é completamente renovada em cerca de um mês (Jensen, 2000).

Células tronco são definidas como células progenitoras multipotentes capazes de se auto renovarem e se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares (Fontes, 1999). Embora os primeiros estudos tenham se direcionado para a pesquisa de células tronco hematopoiéticas, essas células já foram reconhecidas em outros tecidos, como na pele. A identificação e o isolamento físico de células tronco epiteliais têm sido considerados de extrema importância para a obtenção de uma terapia gênica de longa duração. Inicialmente, procurou-se identificar células tronco epidérmicas por análise funcional com base no comportamento do clone produzido por células individuais (velocidade de proliferação, capacidade de auto-renovação) (Barrandon, 1987).

Infelizmente os ensaios de análise funcional não são práticos e consomem muito tempo para serem considerados em rotina de laboratório.

Mais recentemente, duas estratégias têm sido consideradas importantes na identificação de células tronco epidérmicas: a caracterização de marcadores moleculares específicos (preferencialmente marcadores de superfície que permitam a seleção das células); e o desenvolvimento de ensaios para medir a porcentagem de células tronco em uma dada população (Watt, 2000). Sua caracterização, entretanto, é pobre devido ao pequeno conhecimento de marcadores moleculares específicos que permitam distingui-las de sua progênie (células amplificadoras). Atualmente, análises de cinética celular têm permitido a identificação de células tronco epidérmicas de camundongos como células de ciclo lento, enquanto as células amplificadoras são visualizadas como células de ciclo rápido. Alguns estudos fornecem certos meios para a identificação de células tronco. Estas células foram distinguidas pela presença de altos níveis de expressão de uma molécula de adesão (descrita como α_6) e baixo nível de expressão de marcadores de superfície (descritos como 10G7), relacionados com proliferação (Li, 1998; Tani, 2000). Estes marcadores, entretanto, não são suficientes para separar células tronco de células amplificadoras, e mais estudos de marcadores celulares estão sendo realizados com esse propósito.

Apesar da falta de técnicas de isolamento de células tronco, a expressão de proteínas durante longo períodos por queratinócitos transduzidos têm indicado que estas células foram transduzidas (Mathor, 1996; Deng, 1997; Kolodka, 1998; White, 1998).

3.6 Modelos animais

A utilização de modelos animais com doenças semelhantes às aquelas que acometem os humanos é indispensável para o estudo de modelos de terapia gênica. Para a

determinação do alcance sistêmico das proteínas produzidas por células transduzidas, bem como de sua atividade biológica, o modelo animal mais utilizado é o camundongo.

Camundongos com deficiência na produção de hormônio de crescimento têm sido usados para testes *in vivo* de modelos de terapia gênica.

Em camundongos, foram identificados três genes mutantes recessivos não alélicos que causam nanismo como resultado na diminuição da produção de hormônio de crescimento (GH). Esses mutantes são referidos como *little* (lit), *Snell dwarf* (dw) e *Ames dwarf* (df). No caso do *little* a deficiência do GH é isolada, enquanto no *Snell* e no *Ames* há deficiência de outros hormônios (PRL, TSH e GH; PRL, TSH, GH, LH e FSH respectivamente). Das três mutações, o camundongo *little* é o menos afetado quanto ao retardo no crescimento chegando a obter dois terços do tamanho normal. Os níveis de GH no soro de homozigotos para o gene *little* (lit/lit) são significativamente inferiores aos níveis de GH em camundongos heterozigotos (lit/+) (TAB. 3.3).

TABELA 3.3: Níveis de hormônio de crescimento na glândula pituitária e no soro de camundongos lit/lit e lit/+.

genótipo	sexo	Hormônio de crescimento	
		soro (ng/mL)	pituitária (μ g/mg peso úmido)
lit/+	macho	8,50 \pm 0,75	54,6 \pm 10,2
lit/lit	macho	0,61 \pm 0,09	3,6 \pm 0,01
lit/+	fêmea	2,85 \pm 0,33	40,0 \pm 9,3
lit/lit	fêmea	ND*	3,4 \pm 0,7

ND*: não detectável

Em comparação ao camundongo lit/+, a glândula pituitária do camundongo mutante tem aproximadamente 6 a 8% da concentração normal de hormônio de crescimento (Cheng, 1983).

Os camundongos anões da linhagem C57BL/6J-GHRH^{lit} (little) possuem uma mutação autossômica recessiva no gene do receptor do fator liberador do hormônio de crescimento (GHRH) e vêm sendo usados em ensaios biológicos com o hormônio de crescimento. Lin e colaboradores (Lin, 1993) descobriram uma mutação pontual no gene do receptor hipofisário do fator hipotalâmico liberador do hormônio de crescimento nesses animais. Essa mutação acarretou a alteração do segundo nucleotídeo do códon 60, levando à troca de um resíduo de ácido aspártico por um resíduo de glicina no domínio N-terminal do receptor. Essa alteração gênica resultou em falha na transmissão de sinais mediados pelo receptor. As conseqüências fenotípicas dessa mutação são análogas àquelas manifestadas no nanismo humano por deficiência isolada de hormônio de crescimento do tipo I. O mecanismo preciso pelo qual o gene mutante *lit* exerce seus efeitos, entretanto, não está ainda muito bem elucidado.

3.7 Desafios e perspectivas futuras

O primeiro protocolo de terapia gênica aprovado para uso em humanos em 1989 teve como objetivo a investigação de efeitos colaterais dos protocolos de terapia gênica (Rosenberg, 1990). Após 18 meses, o primeiro protocolo com fim terapêutico focou a cura da Imunodeficiência Severa Combinada (SCID), onde duas crianças foram tratadas pela introdução do gene funcional da enzima adenosina deaminase (ADA) (Culver, 1991). Inicialmente essa terapia falhou e o tratamento farmacêutico teve que ser continuado. De acordo com Blaese, os resultados clínicos foram variáveis em alguns pacientes tratados para SCID, mas, em três crianças tratadas ao nascimento, foi demonstrada persistência de expressão do vetor após mais de 12 meses do procedimento (Orkin, 1995). Novos avanços em metodologias de transdução retroviral levaram a melhores resultados para o tratamento de quatro pacientes com SCID

(Bunting, 1998). Recentemente, pode-se citar tratamentos bem sucedidos realizados para essa doença em 5 pacientes na França (Cavazzana-Calvo, 2000).

Uma ampla variedade de experimentos clínicos envolvendo pacientes com AIDS está sendo realizada com alguma evidência de eficácia. Muitos resultados de sucesso podem ser citados, mas a terapia gênica está longe de atender às expectativas geradas em seu início. De fato essa nova tecnologia tem sido analisada muito mais quanto as suas promessas ainda não cumpridas do que quanto a seus resultados obtidos. As opiniões se dividem quanto ao tempo necessário para que esta tecnologia realmente funcione. Teme-se que será necessário tanto tempo para que isto ocorra, que outras soluções podem chegar à frente da terapia gênica. Pode-se citar, entretanto, opiniões mais otimistas. Membros do conselho do *National Institutes of Health* (NIH) são unânimes no reconhecimento do potencial, a longo prazo da terapia gênica no controle de doenças humanas. Para eles a terapia gênica funcionando nos sistemas de saúde significará um desenvolvimento na medicina comparável a descobertas como a introdução de técnicas de assepsia, antibióticos, vacinas e transplante de tecidos. Leva-se em consideração, entretanto, que a aplicação clínica dessa tecnologia emergente está em estágios iniciais de desenvolvimento e muitos problemas devem ser superados até que benefícios terapêuticos significativos sejam obtidos (Orkin, 1995).

Grobhans e colaboradores (Grobhans, 2000) sugerem que três requerimentos são necessários para que se obtenha sucesso em protocolos de terapia gênica: o DNA deve ser transportado para as células alvo com alta eficiência e com efeitos colaterais aceitáveis; a introdução do DNA não pode causar mudanças indesejadas; e pelo menos a expressão estável, mas principalmente a regulável, deve ser garantida. Morgan e colaboradores (Morgan, 1993) afirmam que, para que a terapia gênica seja amplamente utilizada, vetores necessitam ser desenvolvidos de forma que alcancem especificamente as células alvo; da mesma forma a integração do DNA deve ser em

um sítio seguro do cromossomo, ou deve recombinar homologamente com o gene defectivo para tomar seu lugar. Isso diminuiria a potencial iniciação de eventos que levassem à malignidade. Segundo Kay e colaboradores (Kay, 1997), além da habilidade de alcançar as células alvo, o vetor deve assegurar ainda que o novo gene integrado não atinja as células germinativas.

Acredita-se que o limitado conhecimento em biologia celular de células tronco seja uma grande barreira para os estudos de transferência gênica. O conselho do *NIH* sugere que, para a obtenção de uma terapia gênica de sucesso é necessário o melhor entendimento da heterogeneidade das células tronco. Além disso, grande ênfase deve ser dada para o entendimento de virologia básica visando o desenvolvimento de vetores virais mais eficientes quanto ao transporte do DNA e especificidade de células alvo. Modelos animais para ensaios pré-clínicos que simulem doenças humanas devem ser também mais bem desenvolvidos (Orkin, 1995).

Todos estes requisitos devem visar o alto nível de expressão do transgene terapêutico; uma demonstração clara de sua eficácia em modelos animais e a capacidade de regular os níveis sistêmicos do produto terapêutico (Taichman, 1999).

4 Materials

4.1 Principais equipamentos e acessórios

- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10 A – SHIMADZU (MD, EUA) – acoplado a um detector de UV SPD-10 A e a um programa de computador Class VP;
- Autoclave de mesa, série 2100 – KAVOKLAVE (São Paulo, SP, Brasil);
- Banho-maria, modelo 100 – FANEN (São Paulo, SP, Brasil);
- Centrífuga de bancada, modelo LS 3 plus – CELM (São Paulo, SP, Brasil)
- Centrífuga para secagem de DNA, DNA speed vacDNA 110 – SAVANT INSTRUMENTS, Inc. (New York, NY, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, Super Speed RC-2B – SORVALL (Newtown, Connecticut, EUA);
- Coluna de exclusão molecular TSK G 2000 SW (60 cm x 7,5 mm), tamanho de partículas 10 μm e poros de 125 Å – TOSOHAAS (Montgomeryville, PA, EUA);
- Contador gama tipo “poço”, Cobra auto-gamma – PACKARD INSTRUMENT COMPANY (IL, EUA);
- Cuba de transferência, LKB 2117 – 250 Multiphor II Novablot – PHARMACIA (Upsalla, Suécia);
- Cuba eletroforética, SE600-15-15 – PHARMACIA BIOTECH (São Francisco, CA, EUA);
- Eletroporador II – INVITROGEN (San Diego, CA, EUA);
- Estufa para cultura bacteriológica, 002 CB – FANEN Ltda. (São Paulo, SP – Brasil);
- Estufa para cultura de células, 3159 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- Filmes de raios - X Kodak X-OMAT – KODAK (St. Louis, MO, EUA);
- Fluxo laminar vertical classe II A/B3, 1140 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- Fluxo laminar horizontal, classe I – VECO (Campinas, SP, Brasil);
- Material plástico estéril descartável para cultura celular, CORNING COSTAR CORP. (Cambridge, MA, EUA);

- Material plástico estéril descartável para cultura celular, NALGENE COMPANY (Rochester, NY, EUA);
- Membranas de filtração de 0,22 µm – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Microscópio invertido, ID 03 – CARL ZEISS (Oberkochen, Alemanha);
- Pré-coluna SW (7,5 cm x 7,5 mm) - TOSHAAS (Montgomeryville, PA, EUA);
- Purificador de água, Milli-Q-plus- MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Junior – THERMOLYNE (Dubuque, IA, EUA);
- Sistema de estocagem de criotubos, 1°C Freezing container – NALGENE COMPANY (Rochester, NY, EUA);
- Tubos descartáveis para radioimunoensaio de poliestreno – EMTEL (São Paulo, SP, Brasil).

4.2 Principais reagentes e acessórios para biologia molecular

- β-mercaptoetanol - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Ágar-ágar purificado – MERK (São Paulo, SP);
- Agarose – GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Bacto-triptona – DIFCO INTERLAB (São Paulo, SP);
- Brometo de etídio –LKB-PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- Bromofenol - MERK (São Paulo, SP);
- Clorofórmio p. a. - MERK (São Paulo, SP);
- Enzima de ligação T4 DNA ligase - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Enzimas de restrição – GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- Fenol p.a. – MERK (São Paulo, SP, Brasil);
- Filtro de nitrocelulose Hybond-C 0,45µm - PHARMACIA (Upsalla, Suécia);

- Formaldeído –NUCLEAR (São Paulo, SP, Brasil);
- Glicerol – MALLINCKRODT BAKER (Cidade do México, México);
- Glicina - MERK (São Paulo, SP);
- Marcadores de peso molecular – DNA, (λ) bacteriófago λ clivado com as enzimas EcoRI e Hind III, apresentando as bandas de 21,0 - 5,0 - 4,9 - 4,3 - 3,5 - 2,0 - 1,9 - 1,6 - 1,4 - 0,9 - 0,8 - 0,6 e 0,1 Kb; (L) 100bp Ladder; (P) plasmídeo pUC 19 clivado com a enzima Hae III, apresentando as bandas de 0,59 - 0,56 - 0,43 - 0,30 - 0,27 - 0,26 - 0,17 e 0, 10 Kb - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Papel filtro, Blotting Pad 707 - UWR SCIENTIFIC PRODUCTS (West Chester, PA, EUA);
- Sistema para extração de DNA em larga escala, QIAGEN Gel Extration Kit - QIAGEN (Hilden, Alemanha);
- Sistema para extração de DNA em pequena escala, QIAGEN Quiaprep Spin - QIAGEN (Hilden, Alemanha);
- Sistema para purificação de DNA, QIAGEN Quiaquick Nucleotide Removal Kit - QIAGEN (Hilden, Alemanha);
- Sistema para remoção de RNA, QIAGEN RNeasy Mini Kit - QIAGEN (Hilden, Alemanha).

4.3 *Preparações padrão, antissoros e reagentes para imunoensaios*

- Anticorpo policlonal anti-rGH (lote # AFP 5672099) fornecido pelo Dr. A. F. Parlow - *National Hormone and Pituitary Program* (NHPP, Torrance, CA , EUA);
- Azul dextran 2000 - PHARMACIA (Uppsala, Suécia);
- Cloramina - T p. a. - MERCK, (São Paulo, SP);
- Cloreto de sódio p.a. - MERCK, (São Paulo, SP);
- Fosfato de sódio bibásico p. a. - MERCK, (São Paulo, SP);
- Fosfato de sódio monobásico p. a. - MERCK, (São Paulo, SP);
- Leite em pó desnatado, Molico - NESTLÉ (São Paulo, SP);
- Metabissulfato de sódio p.a. - CARLO ERBA (São Paulo, SP);

- Na¹²⁵I livre de carreadores e oxidantes com atividade específica de 11.100 – 22.200 MBq/mL (300 – 600 mCi/mL) – NORDION EUROPE S.A. (Fleurus, Bélgica);
- Preparação de mGH hipofisário altamente purificada, para iodinação, fornecido pelo Dr. A. F. Parlow (lote # AFP 10783B) – *National Hormone and Pituitary Program* (NHPP, Torrance, CA , EUA);
- Preparação de referência de mGH hipofisário fornecido pelo Dr. A. F. Parlow (lote # AFP 10783B) – *National Hormone and Pituitary Program* (NHPP, Torrance, CA , EUA);
- Preparação padrão de hGH recombinante (WHO 88/624) gentilmente cedido pelo *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, Inglaterra);
- Proteína A - SIGMA (St. Louis, MO, EUA) marcada com ¹²⁵I no IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP);
- Resinas cromatográficas sephadex G 100 e G 150 - PHARMACIA (Uppsala, Suécia);
- Segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro - IPEN-CNEN/SP (São Paulo, SP);
- Soro albumina bovina (BSA), RIA grade (fração V) – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Soro de coelho normal - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Tris - PHARMACIA (Uppsala, Suécia);
- Tween – 20, SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

4.4 Principais reagentes e acessórios para cultura celular

- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) – CARLO ERBA (São Paulo, SP);
- Adenina – SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Bicarbonato de sódio – GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Brometo de hexadimetrina – ALDRICH (Milwaukee, EUA);
- Cloreto de cálcio – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – MERK (São Paulo, SP, Brasil);
- Dispase II – BOEHRINGER (Mannheim – Alemanha);

- Fator de crescimento epitelial humano - INVITROGEN (Carisbad, CA, EUA);
- Frasco homogeneizador para extração celular - WHEATON (Milville, NJ, EUA);
- Geneticina (G418), Geneticin® - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Gentamicina - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Glicose p.a. - MERK (São Paulo, SP, Brasil);
- Glutamina - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- HEPES - SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Hidrocortisona - CALBIOCHEM - NOVABIOCHEM CORPORATION (La Jolla, CA, EUA);
- Insulina - SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Meio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Meio F12 de Ham - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Penicilina-estreptomomicina - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Rodamina B - SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Soro de bovino neonato (SBN) - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Soro fetal bovino (SFB) - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Toxina colérica - SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Transferrina - SIGMA (ST. Louis, MO, EUA);
- Tripsina - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Trypan blue 0,4% - GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

4.5 Cepa de *E. coli* utilizada

HB2151 - cepa que possui o genótipo K12 ara Δ lac-pro, thi (F', proAB, lac^qZ, Δ M15) (Maniatis, 1989).

4.6 Plasmídeo utilizado

pKLMGH – plasmídeo que contém o cDNA do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) (Gunning, 1987). Foi gentilmente cedido pela Dra. Patrícia L. Chang da Universidade Mc Master (Hamilton, Ontário, Canadá). Um desenho esquemático do plasmídeo pKLMGH destacando seus principais componentes se encontra na FIG. 4.1.

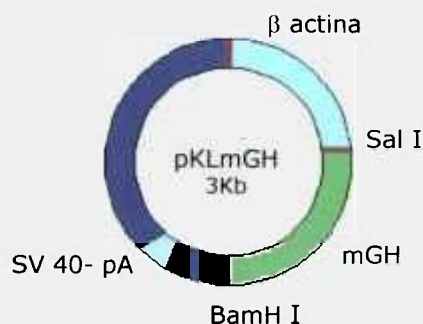


FIGURA 4.1: Desenho esquemático do plasmídeo pKLMGH. β -actina: seqüência de DNA correspondente ao promotor β -actina; Sal I e BamH I: sítios de restrição utilizados para a obtenção do cDNA do hormônio de crescimento de camundongo (mGH); SV 40 – pA: região de poliadenilação do SV 40.

4.7 Vetor retroviral utilizado

pLXSN - vetor retroviral defeitivo com 5874 pares de bases derivado do MoMuLV (vírus da leucemia murina de Moloney). Contém duas seqüências LTR (*Long Terminal Repeat*), possui o gene de resistência à ampicilina (amp^r) e à neomicina fosfotransferase (neo^r) e o seu sítio de clonagem, para a inserção do gene de interesse, é constituído dos seguintes sítios de restrição: Eco RI, Hpa I, Xho I e BamH I (Miller, 1989). Este vetor não contém as seqüências virais *env* (gene que expressa proteínas do capsídeo viral) e *pol* (gene que expressa a enzima transcriptase reversa) e na seqüência viral *gag* (gene que expressa proteínas do corpo viral) o ATG foi trocado por TGA. O gene ψ^+ (*psi*) foi mantido e expressa uma proteína que atua como sinal de encapsidamento. O vetor pLXSN possui ainda a origem de replicação do vetor bacteriano pBR322 possibilitando sua propagação em bactérias. Um desenho esquemático do vetor retroviral pLXSN destacando seus principais componentes se encontra na FIG. 4.2.

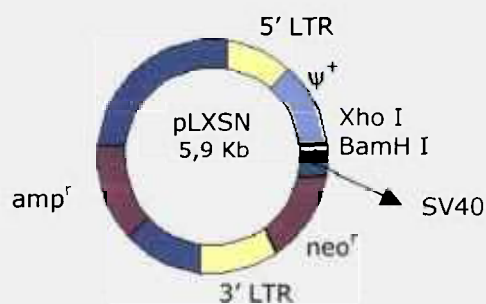


FIGURA 4.2: Desenho esquemático do vetor retroviral pLXSN. Seus principais componentes são: 3' LTR e 5' LTR (Long Terminal Repeat): seqüências de promotor do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV) onde 5' LTR é o promotor que controla a expressão do gene de interesse e 3' LTR contém sinais de integração e poliadenilação; neo^r: gene que confere resistência à geneticina (neomicina fosfotransferase); amp^r: gene que confere resistência à ampicilina (β -lactamase); SV40: promotor do *Simian vírus* que controla a expressão do gene neo^r; ψ^+ : sinal de empacotamento viral; Xho I e BamH I: sítios de restrição utilizados para linearização do vetor e inserção do mGH.

4.8 Linhagens celulares utilizadas

4.8.1 Células de empacotamento

Duas linhagens de fibroblastos de alta eficiência e segurança foram utilizadas como células de empacotamento: GP+E86 e GP+ENV+AM12.

4.8.1.1 Fibroblastos GP+E86

As células GP+E86 são fibroblastos de camundongos NIH-3T3 que foram cotransfectadas com plasmídeos pgag-polgpt (contendo os genes *gag* e *pol*) e penv (contendo o gene *env*). Essas seqüências (*helper virus*) viabilizam a capacidade de infecção do vetor retroviral defeutivo após sua transfecção. As partículas virais produzidas por estas células possuem em seus capsídeos proteínas que reconhecem receptores de células de camundongo, ou seja, essa linhagem celular é ecotrófica (produtora de partículas virais capazes de infectar somente células murinas)

(Markowitz, 1988a; Markowitz, 1988b). Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Bank – *Department of Genetics & Development, da Columbia University (NY, EUA)*.

4.8.1.2 *Fibroblastos GP+ENV+AM12*

Do mesmo modo, estas células são fibroblastos de camundongo NIH-3T3 que foram cotransfectadas com plasmídeos pgag-polgpt (contendo os genes *gag* e *pol*) e penv (contendo o gene *env*). Nessa linhagem, porém, o gene *env* transfectado expressa proteínas do capsídeo viral capazes de infectar tanto células murinas como células humanas consistindo assim de uma linhagem anfotrófica (partículas virais reconhecem receptores de células humanas e de células murinas) (Markowitz, 1988a; Markowitz, 1988b). Essa linhagem foi também cedida pelo Dr. Bank – *Department of Genetics & Development, da Columbia University (NY, EUA)*.

4.8.2 *Células utilizadas para ensaio de titulação viral e como camada de sustentação: fibroblastos NIH-3T3 e NIH-3T3-J2*

São fibroblastos de camundongo. As NIH-3T3 foram utilizadas em ensaios de titulação viral e as NIH-3T3-J2 utilizadas como camada de sustentação na cultura de queratinócitos. Essas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlo Pincelli (Modena, Itália).

4.8.3 *Células alvo: queratinócitos humanos*

Os queratinócitos foram obtidos a partir de pele humana resultante de cirurgia plástica (mamoplastia) seguindo o método descrito por Green e colaboradores (Green, 1979), modificado em nosso laboratório.

5 Métodos

5.1 Amplificação dos plasmídeos

5.1.1 Transformação de bactérias *E. coli*

As cepas de *E. coli* competentes foram transformadas, com os plasmídeos de interesse, pelo método de eletroporação utilizando 1,5 kV; 25 mA e 25 W (Dower, 1988) ou pelo método do cloreto de cálcio (Maniatis, 1989).

5.1.2 Condições de crescimento

As cepas bacterianas transformadas com os plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio LB (extrato de levedura 0,5%, bacto-triptona 15% e NaCl 0,17 M) com ampicilina (100µg/mL). O cultivo foi realizado à temperatura de 37°C em agitação de 250 rotações por minuto durante 16 horas.

5.1.3 Extração e purificação dos plasmídeos

A extração dos plasmídeos da bactéria transformada se deu por lise alcalina seguida de purificação em colunas de afinidade utilizando sistemas comerciais da QIAGEN. O protocolo é baseado em troca de tampões com alteração de pH, sendo que para a retenção do DNA na coluna foi utilizado um tampão pH 7,0 (NaCl 1,0M; MOPS 50mM e etanol 15%). Para sua eluição foi utilizado um tampão pH 8,2 (NaCl 1,25M; MOPS 50mM e etanol 15%).

5.1.4 Remoção de RNA

A remoção de RNA da solução de DNA foi feita adicionando-se uma mistura de 50% fenol e 50% clorofórmio a um volume igual da amostra. Essa mistura foi submetida à agitação e posteriormente à centrifugação a 12000g durante 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se um volume de clorofórmio igual ao anterior. Seguiu-se de homogeneização e centrifugação nas mesmas condições. Adicionou-se ao novo sobrenadante acetato de sódio 0,3M e dois volumes iguais aos da amostra de etanol. O sobrenadante foi então incubado a 0°C por 15 minutos e submetido novamente à centrifugação a 12000g durante 2 minutos. O DNA precipitado foi lavado com o mesmo volume de etanol 70%, centrifugado e

secado em centrífuga liofilizadora. Opcionalmente, foi também utilizado o sistema comercial para remoção de RNA da QIAGEN.

5.1.5 Separação e purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados com luz ultravioleta. O fragmento de gel contendo o DNA de interesse foi isolado e a purificação do DNA foi feita com o uso do sistema comercial de extração de DNA da QIAGEN.

5.2 Reações de digestão e de ligação de fragmentos de DNA

As reações de digestão dos plasmídeos para retirada do inserto de interesse (mGH) ou linearização do vetor retroviral foram realizadas mediante utilização de enzimas específicas (Xho I, BamH I, Sal I) sob as condições determinadas pelo fabricante. As reações de ligação do inserto (mGH) ao vetor (pLXSN) foram realizadas utilizando 1 unidade de T₄ DNA ligase para 100 ng de DNA com incubação de 16 horas a 4°C. A proporção vetor-inserto foi de 1:2.

5.3 Cultura de fibroblastos

A manutenção destas linhagens (GP+E86, GP+ENV+AM12, NIH-3T3 e NIH-3T3-J2) foi feita com o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com 10% de soro de bovino neonato (SBN), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL - 100 pg/mL) e glutamina (4 mM) a um pH de 7,2 tamponado com bicarbonato de sódio (44 mM). O meio possui indicador vermelho fenólico permitindo visualizar alterações no pH. As células cultivadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂.

5.4 Extração de queratinócitos humanos

Os queratinócitos foram obtidos a partir de fragmentos de pele derivados de cirurgia plástica estética de mama de mulheres normais com idade entre 23 e 30 anos. A área do fragmento variou de 3 a 6 cm². Durante a cirurgia, os fragmentos foram transferidos sob condições assépticas para tubos de 50 mL contendo meio de cultura

para queratinócitos sem adição de soro e encaminhados para o nosso laboratório. O procedimento de extração foi realizado de acordo o método de Rheinwald e Green (Rheinwald, 1975) modificado em nosso laboratório. Fibroblastos NIH-3T3-J2 foram irradiados em bomba de cobalto (Co^{60}) a uma dose de 60 Gy, e colocados em cultura numa densidade de 2×10^4 células por cm^2 com meio para queratinócitos. Estas células serviram de camada de sustentação para os queratinócitos.

Os fragmentos de pele tiveram seu tecido gorduroso retirado e foram cortados em pequenos pedaços (aproximadamente 2 cm^2) com tesoura cirúrgica. Foram, então, embebidos em meio DMEM a 37°C adicionado de dispase (2,5 mg/mL) e penicilina/streptomina (100 UI/mL - 100 pg/mL) e incubados por 16 horas a 4°C . Subsequentemente, os fragmentos foram retirados do meio contendo dispase cuidadosamente, pois a epiderme pode se destacar facilmente neste momento, colocados em uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro e lavados duas vezes com solução fosfato-salina (PBS - NaCl 0,15M e Na_3PO_4 0,01M, pH 7,4) adicionada de EDTA (0,002%). A seguir, o epitélio fino e transparente foi retirado de cada fragmento, com o auxílio de uma pinça cirúrgica, colocado em frasco homogeneizador contendo 12 mL de PBS adicionados de tripsina (0,1%) e EDTA (0,002%), pré-aquecida a 37°C . Este frasco possui uma barra vertical central presa à tampa, sendo que na sua porção inferior há uma barra horizontal magnética que promove rotação do conteúdo do frasco quando disposta sobre plataforma agitadora. A rotação foi realizada a 120 rpm no interior de uma estufa para cultura celular. O frasco possui duas tampas laterais que permitem a circulação de CO_2 da estufa. A agitação foi mantida por 6 minutos e o sobrenadante com as células suspensas foi retirado do frasco agitador e transferido para um tubo de 50 mL contendo 12 mL de meio de crescimento para queratinócitos (KGM - *Keratinocyte Growth Medium*) com 10% de soro fetal bovino (SFB) com o objetivo de inativar a tripsina. Essa solução foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 3 mL de KGM contendo SFB a 10%.

Foi realizada a contagem de células e estas foram colocadas em cultura numa densidade de 2×10^5 células por cm^2 sobre a camada de sustentação (fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados). A eficiência da cultura celular diretamente do tecido é de 1% e levam cerca de duas semanas para que as células comecem a se multiplicar adequadamente. Uma parte dos queratinócitos foi congelada em KGM com 30% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), logo após a extração.

Todos os procedimentos descritos foram realizados sob condições assépticas em fluxo laminar vertical classe II.

5.5 Cultura de queratinócitos humanos

Os queratinócitos extraídos foram cultivados de acordo com o método de Green e colaboradores (Green, 1979). Inicialmente 4×10^5 células por cm^2 foram cultivadas sobre uma camada de sustentação composta de fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados a 60Gy e cultivados em meio de crescimento para queratinócitos (KGM). A cultura foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . O KGM é composto de 70% meio de EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM) e 30% de meio F12 de HAM (Miller, 1989). A este meio foram adicionados soro fetal bovino na proporção de 4%, adenina (0,18 mM), toxina colérica (0,1 nM), penicilina/estreptomicina (100 UI - 100 pg/mL), hidrocortisona (0,4 $\mu\text{g/mL}$), insulina (5 $\mu\text{g/mL}$) e fator de crescimento epidérmico humano (EGF) (10 ng/mL).

5.6 Obtenção de células produtoras do vetor retroviral pLmGHSN

5.6.1 Transfecção transiente das células empacotadoras ecotróficas GP+E86

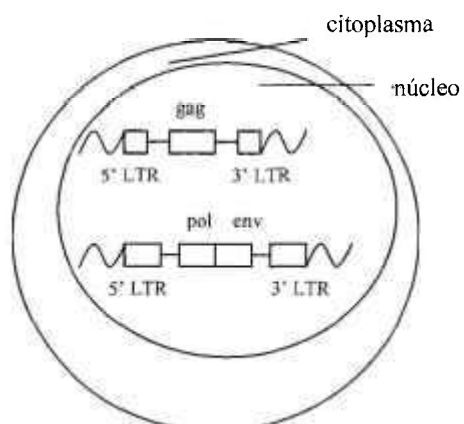
Foram semeadas $1,5 \times 10^6$ células GP+E86 por placa de 100 mm de diâmetro no dia anterior à transfecção, sendo mantidas com meio DMEM em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . A construção retroviral pLmGHSN foi introduzida nessa linhagem celular mediante transfecção transiente pelo método do cloreto de cálcio (Maniatis, 1989). Dessa maneira, 30 μg de pLmGHSN foram adicionados a 1,8 mL de água contendo 200 μL de CaCl_2 (2,5 M) em um tubo de 15 mL. Essa mistura foi adicionada lentamente, gota a gota, a um tubo de 15 mL contendo 2 mL HEPES- PO_4 (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM e HEPES 50 mM). A solução HEPES- PO_4 foi mantida sob borbulhamento com uma pipeta adicional até o fim do gotejamento. Após 30 minutos em temperatura ambiente, a solução foi pipetada sob a cultura de células GP+E86, as quais foram mantidas em estufa por mais 20 minutos. Foram então adicionados 8 mL de DMEM às placas. As células foram incubadas em estufa por 16 horas adicionais.

Após este período, foi realizada a troca do meio e as células foram incubadas por mais 48 horas. O meio (sobrenadante contendo as partículas virais) foi coletado para infecção permanente das células GP+ENV+AM12. Parte do meio foi congelado a -80°C

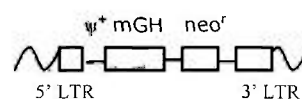
para posterior determinação de expressão de mGH por radioimunoensaio. As células transfectadas foram congeladas em N₂ líquido. O mesmo procedimento foi realizado utilizando somente o vetor pLXSN como controle negativo. Um esquema de produção de partículas virais mediante transfecção de células empacotadoras está representado na FIG. 4.3.

Houve, então, produção de partículas virais defectivas infectantes e liberação destas no sobrenadante. Estas partículas, porém, não são capazes de infectar células humanas. Para que isso ocorra, é necessária a utilização de uma segunda linhagem celular de empacotamento anfotrófica.

(1) célula empacotadora GP+E86



(2) Vetor pLmGHSN



(3) transfecção

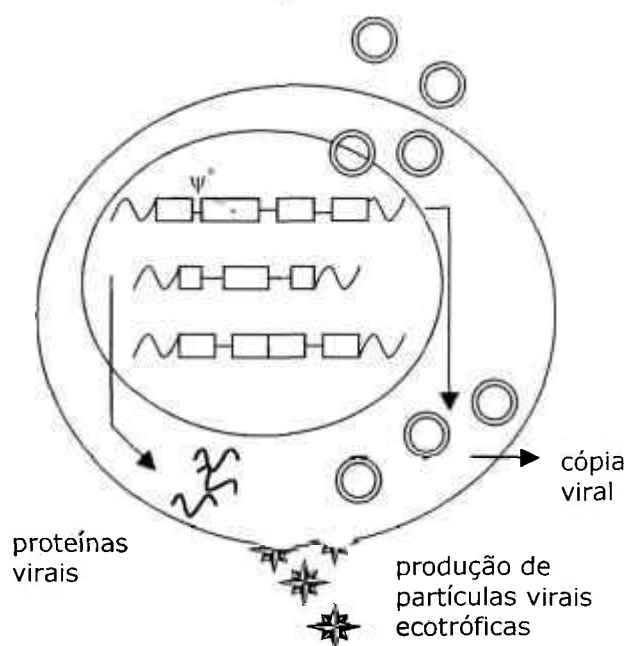


FIGURA 4.3: Representação esquemática da obtenção de células produtoras de partículas virais ecotróficas. (1) célula empacotadora GP+E86 contendo as seqüências gag, pol e env; (2) vetor retroviral contendo o sinal ψ^+ de encapsidiamento; (3) transfecção transiente e produção de partículas virais que reconhecem receptores de membrana de células murinas.

5.6.2 Infecção permanente das células empacotadoras anfotróficas GP+ENV+AM12

Do mesmo modo, foram semeadas $1,5 \times 10^6$ células por placa de 100 mm de diâmetro no dia anterior à transfecção e mantidas com meio DMEM em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Ao sobrenadante resultante da transfecção transiente foi adicionada uma solução de polibreno (brometo de hexadimetrina) a uma concentração de $8 \mu\text{g}/\text{mL}$. O polibreno tem a função de aumentar a permeabilidade da membrana celular melhorando a eficiência da infecção. O sobrenadante foi adicionado à cultura de células GP+ENV+AM12, e manteve-se em estufa com agitação suave a cada 30 minutos. Após 3 horas, foram adicionados 5 mL de meio DMEM contendo a mesma concentração de polibreno e as placas foram conservadas em estufa por 16 horas e, posteriormente, foram submetidas à seleção por geneticina (G418). Um esquema de produção de partículas virais mediante infecção de células empacotadoras está representado na FIG. 4.4.

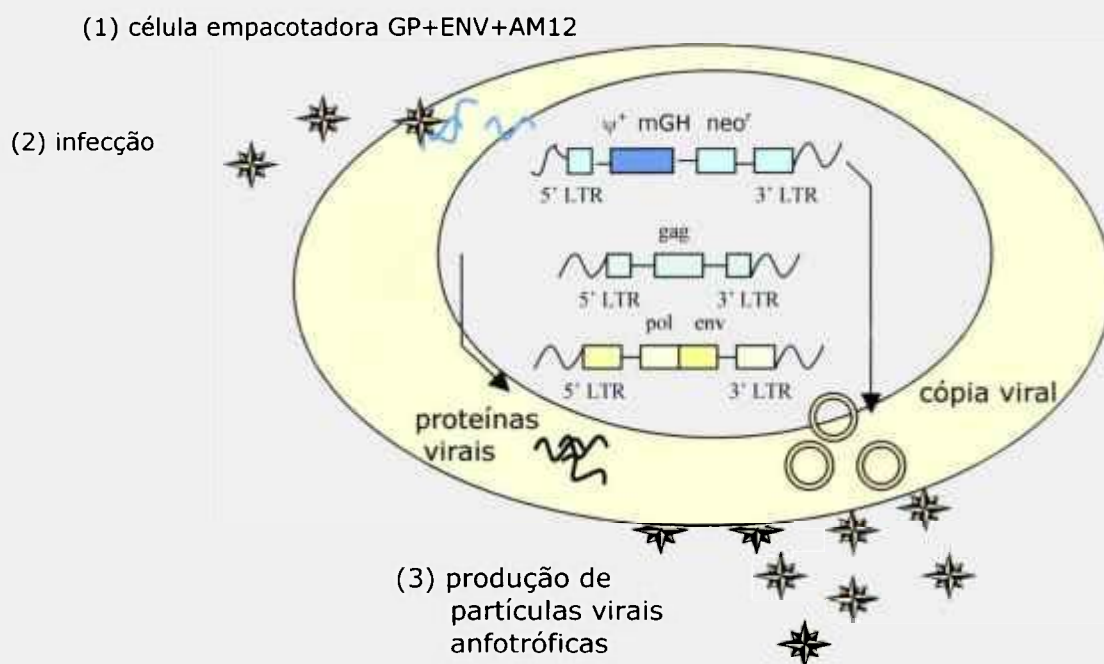


FIGURA 4.4: Representação esquemática da obtenção de células produtoras de partículas virais anfotróficas. (1) célula empacotadora GP+ENV+AM12 contendo as seqüências gag, pol e env; (2) infecção utilizando as partículas retrovirais ecotróficas produzidas como demonstrado na figura anterior; (3) produção de partículas virais que reconhecem receptores de membrana de células humanas.

Após a infecção, a produção de proteínas virais se inicia devido à presença da seqüência ψ contida no cDNA do vetor de expressão.

5.7 Determinação da concentração de geneticina (G418) para seleção de células empacotadoras anfotróficas GP+ENV+AM12 infectadas

Foram cultivadas 10 placas de cultura celular de 10 cm de diâmetro contendo 1×10^6 células GP+ENV+AM12 por placa. O meio DMEM utilizado para o cultivo continha diferentes concentrações de geneticina (0; 0,5; 0,6; 0,7 ou 0,8 mg G418/mL). As placas foram mantidas em estufa por 12 dias.

O parâmetro para a escolha da concentração de G418 mais adequada foi a menor concentração de geneticina por mL que promovesse 100% de morte celular.

5.8 Seleção de células infectadas

Após a infecção, as células GP+ENV+AM12 foram submetidas à cultura em meio contendo G418 (0,6 mg/mL) durante 12 dias. Os clones resistentes à geneticina foram isolados e amplificados. Quando em semi-confluência, o meio de cultura das placas foi trocado e deixado por 24 horas. As células foram, então, tripsinizadas, contadas e congeladas. O sobrenadante resultante das últimas 24 horas foi utilizado para determinação de expressão de mGH por radioimunoensaio, bem como para determinação da capacidade de infecção (titulação) (Mathor, 1994; Bellini, 2001).

5.9 Titulação

Os clones resistentes à geneticina foram titulados utilizando células NIH-3T3 para determinação de suas capacidades de infecção (Mann, 1983). Foram semeadas 5×10^4 células NIH-3T3 em placas de 28 cm² e após 16 horas foram adicionados 0,5 mL do sobrenadante dos clones a serem titulados em diluições de 10^{-3} e 10^{-4} , com adição de polibreno (8,0 µg/mL). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ com agitação a cada 15 minutos. Após 1 hora, foram adicionados às placas, 4 mL de meio de cultura e estas foram novamente incubadas durante 16 horas adicionais. Em seguida, a seleção foi iniciada utilizando-se meio contendo G418 (0,6 mg/mL).

Após 12 dias de seleção, cada placa teve seu meio retirado e as células foram coradas mediante adição de 3 mL de rodamina B numa concentração de 2% em uma solução

de 4% de formaldeído, durante 5 minutos. Após lavagem com água corrente para remoção do excesso de corante, as colônias resistentes foram contadas. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL) utilizando a fórmula:

$$\text{ufc/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição} (10^3 \text{ ou } 10^4)}{\text{volume em mL das partículas virais}}$$

5.10 Transdução de queratinócitos humanos

Foram realizados três métodos diferentes.

5.10.1 Método 1 – contato célula-célula

A transdução dos queratinócitos foi realizada pelo simples contato célula-célula, entre queratinócitos e células empacotadoras anfotróficas produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN (GP+ENV+AM12 -pLmGHSN).

Foram semeados 3×10^5 queratinócitos em uma placa de 10 cm de diâmetro contendo uma camada de sustentação constituída de 3×10^6 células produtoras de partículas e fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados com 60Gy na proporção 2:1. Após sete dias de contato, os queratinócitos foram tripsinizados e semeados novamente sobre uma nova camada de sustentação, constituída somente de fibroblastos NIH-3T3-J2. Quando as células atingiram a semiconfluência, o meio foi trocado e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH.

5.10.2 Método 2 – sobrenadante+polibreno

Foram cultivados 3×10^5 queratinócitos em uma placa de 10 cm de diâmetro previamente semeada com 3×10^6 fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados.

Paralelamente foi realizada a cultura de células anfotróficas produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN (GP+ENV+AM12-pLmGHSN). Quando em confluência, o meio foi trocado por meio sem soro e as células foram conservadas em estufa por 24 horas. Este sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado e filtrado utilizando um filtro de porosidade 0,45 μm . As células foram tripsinizadas, contadas e congeladas. Ao sobrenadante foi adicionada uma solução de polibreno numa concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$. O sobrenadante foi adicionado à cultura de queratinócitos que foi mantida em estufa com agitação suave a cada 15 minutos. Após

4 horas, foram adicionados 3 mL de meio KGM e as placas foram mantidas em estufa por mais 16 horas. O meio foi, então, retirado e trocado por meio KGM. Quando as células atingiram a semiconfluência, o meio foi trocado novamente e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH.

5.10.3 Método 3 – contato célula-célula+polibreno

A transdução dos queratinócitos pelas células anfotróficas produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN (GP+ENV+AM12-pLmGHSN) foi realizada pelo contato célula-célula somada à adição de polibreno ao meio.

Similarmente ao método 1, foram semeados 3×10^5 queratinócitos em uma placa de 10 cm de diâmetro contendo uma camada de sustentação constituída de 3×10^6 células produtoras de partículas e fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados na proporção 2:1. Ao meio de cultura foi adicionada uma solução de polibreno numa concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$, seguido de incubação por 16 horas. O meio foi, então, trocado por meio KGM e após sete dias de contato, os queratinócitos foram tripsinizados e semeados novamente sobre uma nova camada de sustentação, constituída somente de fibroblastos NIH-3T3-J2. Quando as células atingiram a semiconfluência, o meio foi trocado e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH.

5.11 Seleção de queratinócitos transduzidos com o cDNA do mGH

A seleção foi feita com o uso de geneticina devido à existência do gene da neomicina fosfotransferase (neo^r) no vetor pLmGHSN que confere à célula transduzida resistência a este antibiótico.

Foram semeados 3×10^5 queratinócitos transduzidos pelo método 3 (contato célula-célula + polibreno), em placas de 10 cm de diâmetro previamente semeadas com 3×10^6 fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados. Após 48 horas, foram adicionados às placas, meios contendo 0; 0,4; 0,6 e 0,8 mg G418/mL, em duplicata para cada concentração de G418. Quando atingiram a confluência, as células foram tripsinizadas e cultivadas novamente mantendo-se o meio com a mesma concentração de G418. Quando as células desta segunda passagem atingiram a semiconfluência, o meio foi trocado e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH. As células foram tripsinizadas, contadas e congeladas.

5.12 Avaliação da estabilidade de transdução dos queratinócitos

Para verificar a estabilidade dos níveis de mGH expressos pelos queratinócitos em cultura, foram realizadas dosagens do hormônio a cada passagem. Primeiramente foram semeados 3×10^5 queratinócitos transduzidos em uma placa de cultura celular contendo uma camada de sustentação formada por 3×10^6 NIH-3T3-J2 irradiados. Quando as células atingiram a semiconfluência, o meio foi trocado e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH. Neste momento, as células foram tripsinizadas, contadas e passadas para novas placas de cultura na mesma densidade da primeira passagem. Esse procedimento foi repetido durante quatro passagens.

Coletas de meios de queratinócitos não transduzidos foram realizadas como controle negativo.

5.13 Preparação de epitélio de queratinócitos transduzidos e análise de expressão "in vitro"

Foram cultivados 3×10^5 queratinócitos transduzidos em uma placa de cultura celular de 10 cm de diâmetro sobre uma camada de sustentação composta de 3×10^6 fibroblastos NIH-3T3-J2 irradiados e cultivados em meio de crescimento para queratinócitos (KGM).

As células foram mantidas em cultura por 48 horas após atingirem a confluência formando uma camada epitelial espessa, o que levou cerca de 15 dias. O meio foi trocado e coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH e em seguida o epitélio foi destacado da placa de cultura celular com o uso de uma protease neutra denominada dispase. A dispase é capaz de destacar as células da placa sem dissociá-las entre si. Assim, após serem lavadas com meio KGM sem soro, as células foram incubadas com meio KGM contendo dispase (2,5 mg/mL). Após 5 minutos, o epitélio foi destacado da placa de cultura e o meio foi trocado por meio KGM sem soro. Uma gaze antiaderente foi colocada sobre o epitélio preparando-se um enxerto semelhante ao utilizado por Barrandon e colaboradores (Barrandon, 1988). O meio foi, então, coletado após 24 horas para determinação dos níveis de expressão de mGH pelo epitélio destacado.

5.14 Determinação da meia-vida circulatória do hGH e do mGH no camundongo normal (C57BL) e anão (little/little)

A determinação desse parâmetro tem como objetivo avaliar eventuais diferenças no metabolismo desses dois hormônios no camundongo. Os camundongos foram injetados, via intra-peritoneal, com 100 µL de solução salina contendo mGH ou hGH. Após as injeções, os animais foram submetidos à sangria em diferentes tempos (n=4 animais/tempo) usando cada animal em uma única determinação: 0; 5; 10; 15; 20; 30; 45; 60 e 120 min.

A sangria foi realizada via plexo retro-orbital com pipeta Pasteur e o material coletado foi acondicionado em tubos para micro-centrífuga. O sangue resultante foi deixado em estufa à 37°C durante 30 minutos e posteriormente em geladeira a 4°C durante 1 hora. Foi, então, centrifugado durante 6 minutos a 6000 rpm para a separação do soro. A determinação de níveis de hormônio no soro foi feita por radioimunoensaio e a meia-vida foi calculada mediante verificação do tempo necessário em minutos (escala linear) para que a concentração de hormônio no soro em ng/mL (escala logarítmica) decaia à metade do valor máximo alcançado.

5.15 Análise da expressão protéica

5.15.1 Radioimunoensaio (RIA)

A determinação dos níveis de expressão de mGH produzidos em meio de cultura por fibroblastos e queratinócitos transduzidos foi realizada por radioimunoensaio específico para mGH padronizado no IPEN, com sensibilidade de 0,3 ng de mGH/mL. A análise foi realizada em duplicata, em volume total de reação de 300 µL. As curvas dose-resposta foram realizadas com a preparação de referência nas concentrações de 0,78 a 200 ng mGH/mL diluída em meio de cultura celular, e as amostras também foram diluídas no mesmo meio. A técnica empregada foi a de incubação simultânea do padrão ou da amostra com o hormônio radiodado (¹²⁵I-mGH) e com o primeiro anticorpo anti-rGH (antissoro contra hormônio de crescimento de rato), em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, com 0,1% de soroalbumina bovina (BSA) e 0,01% de tween 20 por 18 horas, a 4°C. A diluição ótima estabelecida para o primeiro anticorpo foi de 1:300.000. O ¹²⁵I-mGH foi preparado no IPEN pela técnica da cloramina-T modificada (Ribela, 1993) e utilizado numa concentração de aproximadamente 25.000 cpm

(contagens por minuto). A separação de fração livre da ligada foi realizada pelo método do segundo anticorpo diluído a 1:10, que foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 2 horas a temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos para separação do complexo antígeno-anticorpo. Como controle foram utilizados soros com concentração média de mGH conhecida obtidos de camundongos anões ($1,3 \pm 0,7$ ng mGH/MI; n=8) e de camundongo normal ($6,5 \pm 1,8$ ng mGH/mL; n=8).

5.15.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi realizado conforme descrição de Laemmli (Laemmli, 1970) com gel de separação a 12% de poliacrilamida e gel de empilhamento a 3%. Às amostras do meio de cultura foi adicionado o tampão de amostra a uma concentração final de Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; DTT 25 mM; glicerol 10%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,08 mg/mL e β -mercaptoetanol 1%. As amostras foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas. Cada amostra foi aplicada em uma canaleta do gel e a corrida eletroforética foi realizada aplicando-se uma corrente de 30 mA em cuba eletroforética.

5.15.3 Western blotting

As proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose pelo método semi-seco descrito por Burnette (Burnette, 1981). A transferência ocorreu por eletroeluição do gel em cuba de transferência, utilizando-se filtro de nitrocelulose 0,45 μ m e papel filtro (*Blotting Pad*) embebido em tampão de transferência (glicina 33 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375%, metanol 20%). A corrente foi fixada de acordo com a área do gel usando fórmula estipulada pelo fabricante da cuba: corrente aplicada (mA)=área (cm²) x 0,85. A transferência foi realizada em 1 hora e meia. A membrana, depois de lavada com a solução de NaCl 0,15M e Na₃PO₄ 0,01M, pH 7,4 e leite desnatado a 5% (PBS-L), foi incubada com o anticorpo policlonal anti-rGH diluído a 1:5 x 10⁵ em PBS-L, durante 18 horas. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes com PBS-L e incubada com a proteína A marcada com ¹²⁵I (4 x 10⁵ cpm/mL) em PBS-L por 1 hora. Após a incubação, a membrana foi lavada 4 vezes com PBS-L e 2 vezes com PBS. A autoradiografia foi realizada com a membrana seca.

5.15.4 Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC)

As análises por HPSEC isocrática foram realizadas em aparelho cromatográfico monitorando-se a absorbância a 220 nm. A fase móvel utilizada foi bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0, num fluxo de 1 mL/min. As preparações injetadas foram previamente centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 rpm e os volumes de injeção foram de 10 µL (5 µg da preparação de referência de mGH) ou 200 µL (meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH - meio condicionado) (Dalmora, 1997). Foram coletadas frações de 1 mL para o meio condicionado ao longo de todo o perfil cromatográfico, nas quais foi determinado o conteúdo de mGH por RIA.

6 Resultados

6.1 Obtenção do vetor de expressão retroviral contendo o cDNA do mGH

6.1.1 Isolamento do cDNA do hormônio de crescimento de camundongo

O cDNA do hormônio de crescimento de camundongo foi obtido a partir do plasmídeo pKLMGH, mediante utilização das enzimas de restrição BamH I e Sal I, gerando um fragmento de 750 pb. O fragmento de DNA, depois de purificado, foi aplicado em gel de agarose para determinação aproximada de concentração e análise de pureza.

6.1.2 Linearização do vetor pLXSN

O vetor retroviral pLXSN foi linearizado com as enzimas Xho I e BamH I, cujos sítios de restrição são complementares às extremidades geradas no isolamento do inserto de interesse (mGH). Após linearização, foi feita a purificação do vetor, o qual foi submetido à análise qualitativa e quantitativa por eletroforese em gel de agarose. A análise do gel confirmou a purificação do vetor baseado em seu tamanho (5874 pb) e na qualidade da banda fina, sem espalhamento de DNA.

6.1.3 Ligação do cDNA do mGH ao pLXSN

O cDNA do mGH foi inserido no vetor retroviral pLXSN mediante uma reação de ligação utilizando a *T₄ DNA ligase*. Na FIG. 6.1 representa-se esquematicamente a construção do vetor de expressão pLmGHSN.

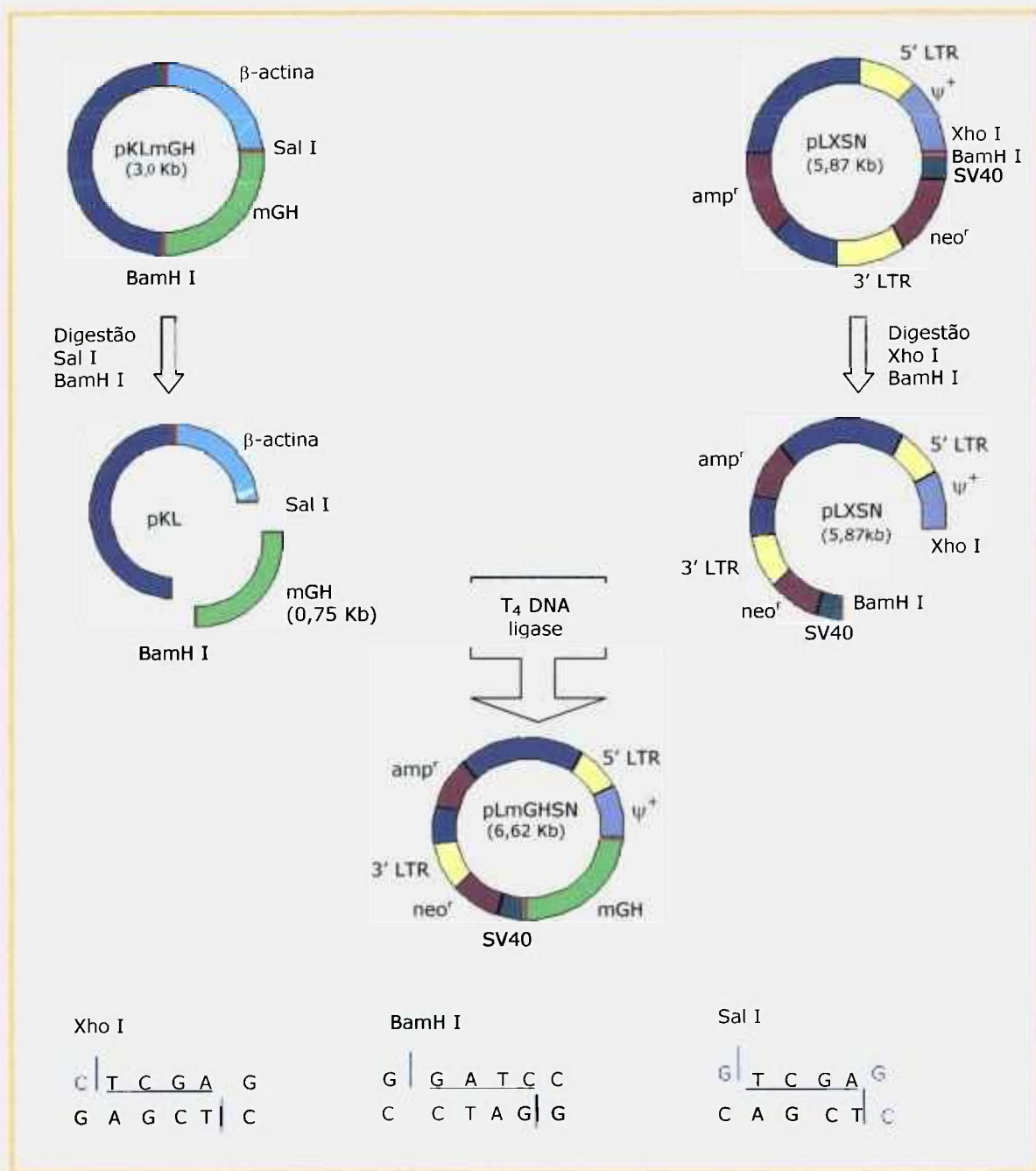


FIGURA 6.1: Demonstração esquemática da construção do vetor de expressão pLmGHSN. Os principais componentes dos vetores utilizados são: β -actina: seqüência de DNA correspondente ao promotor β -actina; 3' LTR e 5' LTR (*Long Terminal Repeat*): seqüências de promotor do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV) onde 5' LTR é o promotor que controla a expressão do gene de interesse e 3' LTR contém sinais de integração e poliadenilação; neo^r: gene que confere resistência à geneticina (neomicina fosfotransferase); amp^r: gene que confere resistência à ampicilina (β -lactamase); SV40: promotor do *Simian vírus* que controla a expressão do gene neo^r; ψ^+ : sinal de empacotamento viral; mGH: seqüência que codifica o hormônio de crescimento de camundongo. Os sítios de restrição utilizados também se encontram detalhado: Xho I, Sal I e BamH I.

Foi, então, feita a transformação das bactérias competentes *E. coli* HB2151 com o produto de reação da ligação, as quais foram subseqüentemente semeadas em ágar LB contendo ampicilina. Foram selecionados 18 clones que comprovaram sua transformação por serem resistentes à ampicilina (gene *amp^r* contido no pLXSN). Após amplificação e extração de DNA dos 18 clones selecionados, o DNA plasmídeo de cada clone foi digerido com as enzimas EcoR I e BamH I. A confirmação da presença do inserto mGH nos mesmos foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A presença do vetor pLXSN (5874 pb) foi verificada em todos os 18 clones e a presença do inserto mGH (750 pb) foi verificada nos clones 6, 9 e 11 (FIG. 6.2).

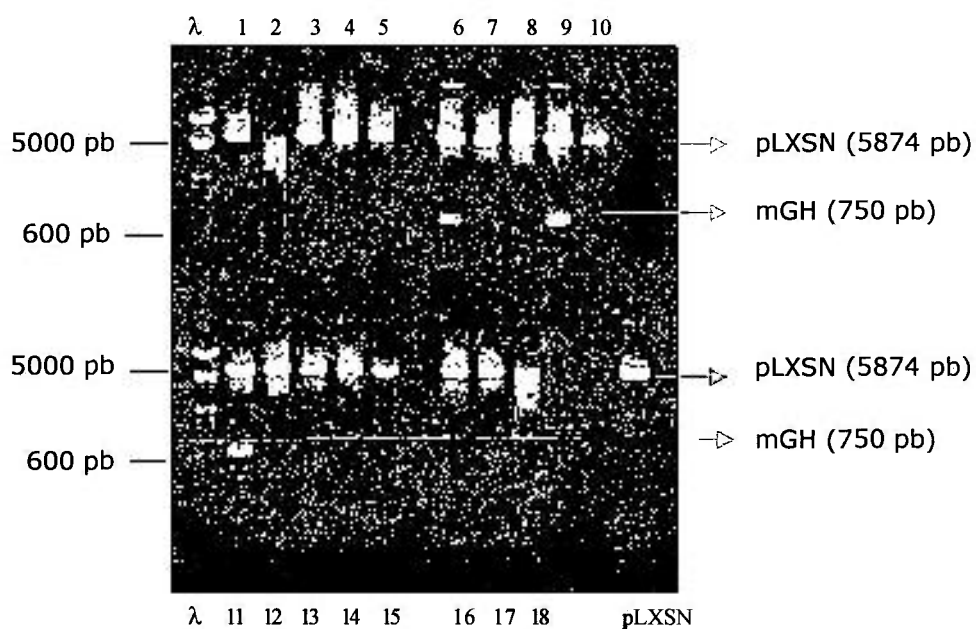


FIGURA 6.2: Análise de restrição do DNA plasmídico para verificação da presença do inserto (mGH) no vetor pLXSN. (λ) Marcador de peso molecular: bacteriófago λ clivado com as enzimas EcoR I e Hind III apresentando bandas de 0,1 a 21 Kb; (pLXSN) vetor pLXSN sem a presença do inserto após linearização com EcoR I; (1 a 18) DNA plasmídico de 18 clones transformados com a reação de ligação pLXSN + mGH após clivagem com EcoR I e BamH I.

6.1.4 Verificação da posição correta do inserto

Novamente análises de restrição foram utilizadas para confirmar a construção correta do vetor de expressão. Para essa verificação foi escolhida uma enzima cujo sítio de restrição estivesse contido tanto no vetor quanto no inserto. Foi realizada, então, uma reação de digestão do vetor pLmGHSN para os clones 6, 9 e 11 utilizando a enzima Hind III. Na FIG. 6.3 ilustra-se as possíveis posições de inserção do cDNA do mGH no vetor pLXSN.

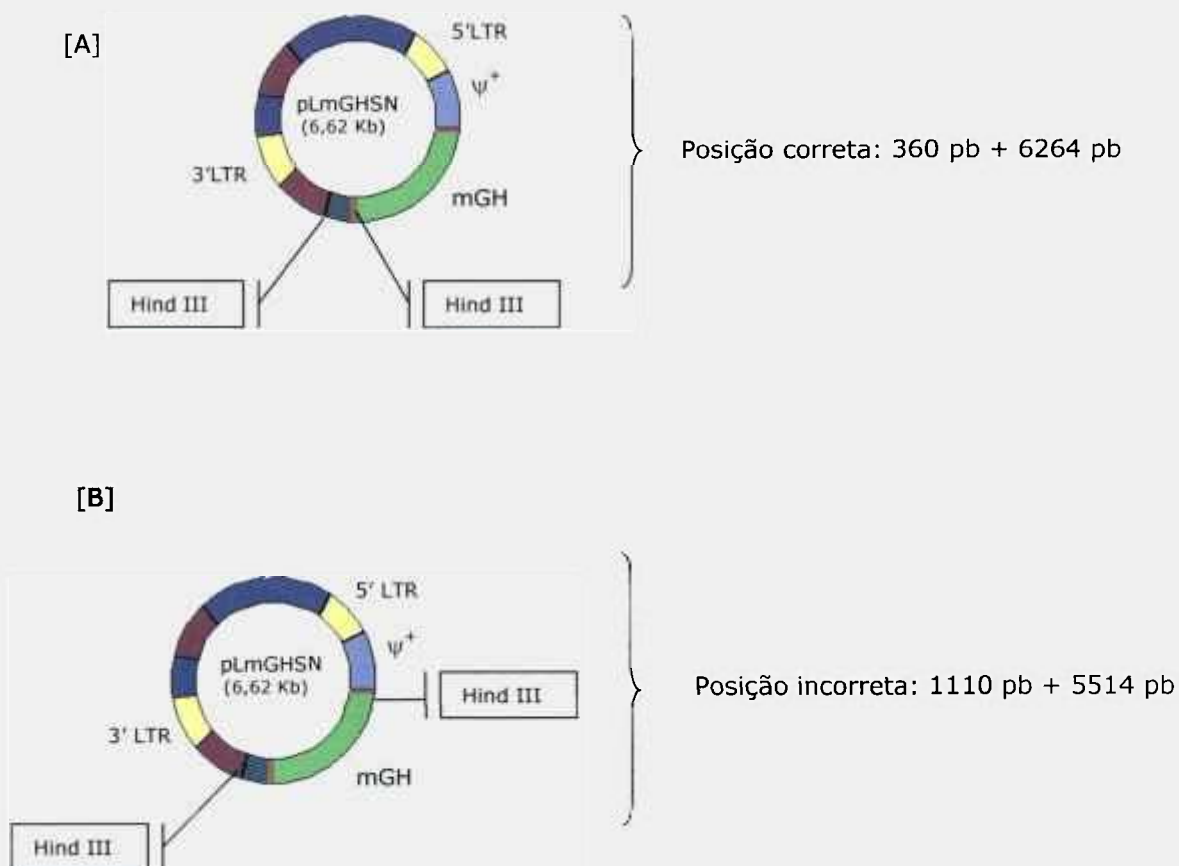


FIGURA 6.3: Desenho esquemático do vetor de expressão pLmGHSN. A figura [A] representa a posição dos sítios de restrição da enzima Hind III com o cDNA do mGH inserido na orientação correta, enquanto a figura [B] representa a inserção incorreta.

A confirmação da posição correta do inserto foi visualizada após eletroforese em gel de agarose a 1%. A digestão do DNA extraído dos clones 6, 9 e 11 com a enzima Hind III originou dois fragmentos de DNA (6264 e 360 pb), confirmando a inserção do mGH na posição correta (FIG. 6.4).

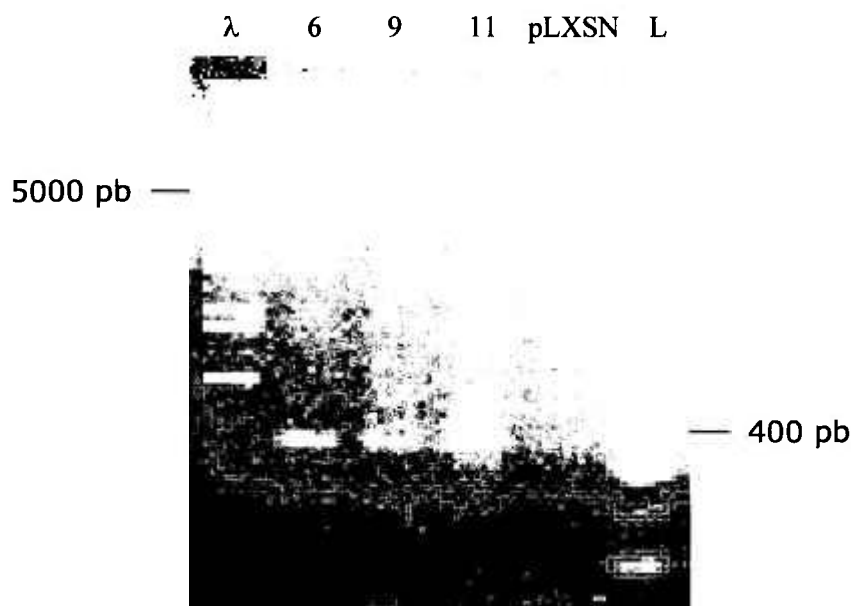


FIGURA 6.4: Análise de restrição do plasmídeo pLmGHSN para verificação da posição correta do inserto mGH. (λ) Marcador de peso molecular: bacteriófago λ clivado com as enzimas EcoR I e Hind III apresentando bandas de 0,1 a 21 Kb; (L) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb; (pLXSN) vetor pLXSN sem a presença do inserto mGH após linearização com EcoR I; (6, 9, 11) DNA extraído dos clones 6, 9 e 11 após clivagem com Hind III.

6.2 *Obtenção de células produtoras de partículas virais contendo o vetor pLmGHSN*

6.2.1 *Determinação da concentração ideal de geneticina para seleção de células infectadas*

A geneticina (G418) é utilizada para seleção de células infectadas visto que o gene neo^r (gene que confere resistência à geneticina) está contido no vetor retroviral.

Células anfotróficas (GP+ENV+AM12) não infectadas foram cultivadas em placas de cultura celular de 10 cm de diâmetro contendo inicialmente 1×10^6 células/placa. O meio utilizado para o cultivo continha diferentes concentrações de geneticina (0,6; 0,7 ou 0,8 mg G418/mL) e cada meio foi adicionado a três placas. Uma placa foi mantida com meio sem G418 como controle. O parâmetro para a escolha da concentração de G418 mais adequada foi a menor concentração que promoveu 100% de morte celular.

O meio contendo 0,6 mg de G418/mL foi suficiente para acarretar 100% de morte celular, determinando-se assim a concentração de G418 que foi utilizada para seleção de células anfotróficas infectadas com o vetor pLmGHSN.

6.2.2 Obtenção de células ecotróficas GP+E86 produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN

Células empacotadoras da linhagem GP+E86 foram transfectadas transientemente com o vetor retroviral pLmGHSN pela técnica de coprecipitação com cloreto de cálcio. O sobrenadante resultante da transfecção, possuindo as partículas virais contendo o vetor pLmGHSN, foi coletado após 48 horas de cultivo e congelado a -20°C para posterior infecção de células da linhagem anfotrófica. No momento da coleta, as células foram tripsinizadas, contadas e congeladas em nitrogênio líquido. Parte do sobrenadante foi congelado separadamente para análise de expressão de mGH.

A determinação do mGH foi realizada por radioimunoensaio (RIA) para o meio de cultura das células GP+E86 transfectadas e não transfectadas. O meio das células transfectadas apresentou 10,5 ng de mGH /mL, enquanto no meio das células não transfectadas não foi detectada a presença de hormônio.

Este resultado foi comparável ao obtido anteriormente em nosso laboratório para estas células transfectadas com o vetor pLhGHSN contendo o gene do hormônio de crescimento humano, quando foram detectados 7,2 ng de hGH/mL (Bellini, 2001).

6.2.3 Obtenção de células anfotróficas GP+ENV+AM12 produtoras de partículas virais contendo o vetor de expressão pLmGHSN

O sobrenadante produzido pelas células ecotróficas produtoras de partículas virais foi utilizado para infecção permanente de células de empacotamento da linhagem anfotrófica. Foi realizada, então, seleção por geneticina (0,6 mg G418/mL de meio de cultura) das células infectadas. Durante a seleção, os clones infectados foram capazes de formar colônias em placa de cultura celular na presença de geneticina.

Foram isolados e amplificados 36 clones. Quando os clones estavam em semiconfluência, o meio de cultura foi trocado. O sobrenadante resultante da infecção foi coletado após 24 horas adicionais de incubação e congelado a -20°C para posterior transdução de queratinócitos humanos. No momento da coleta, as células foram tripsinizadas, contadas e congeladas em nitrogênio líquido. Parte do sobrenadante foi congelado separadamente para análise de expressão de mGH.

Foi realizado um RIA para a quantificação do mGH no meio de cultura das células de empacotamento anfotróficas infectadas com o vetor de expressão pLmGHSN. Na TAB. 6.1 estão apresentados os níveis de mGH produzidos pelos 36 clones. A partir destes resultados, os 18 clones que apresentaram os maiores níveis de expressão de mGH foram também analisados quanto à capacidade de infecção das partículas virais (titulação).

TABELA 6.1: Níveis de mGH determinados por radioimunoensaio no meio de cultura das células anfitriãs infectadas (GP+ENV+AM12-pLmGHSN). Os clones sinalizados apresentaram maior produção de hormônio e foram também titulados.

Clone	mGH		Clone	mGH	
	(ng /mL)	(ng /10 ⁶ células.dia)		(ng /mL)	(ng /10 ⁶ células.dia)
01	18,0	12,9	19	27,0	13,2
02	4,6	1,0	20	29,8	11,9
04	24,5	12,3	21	4,6	0,9
06	23,0	11,8	22	23,5	5,4
07	19,5	5,9	23	58,0	9,8
09	32,5	10,0	24	44,0	22,0
10	9,2	7,7	25	90,0	18,0
11	18,2	7,8	27	99,0	16,7
12	22,9	13,2	28	42,0	10,1
13	18,0	6,8	29	56,0	31,1
14	< 0,78	30	70,0	33,8
15	< 0,78	31	75,0	28,2
16	31,5	7,9	33	150,0	37,5
17	24,2	5,0	35	59,0	17,4
18	14,5	7,1	36	90,0	51,1

A titulação dos clones foi realizada utilizando-se os respectivos sobrenadantes contendo as partículas virais para a infecção de fibroblastos NIH-3T3, e posterior seleção das células infectadas por presença de geneticina no meio de cultura celular (0,6 mg de G418/mL). A visualização das colônias resistentes foi feita por coloração com rodamina B. Na FIG. 6.5 ilustram-se clones que apresentaram alto número de colônias resistentes à geneticina e, portanto, os maiores títulos virais.

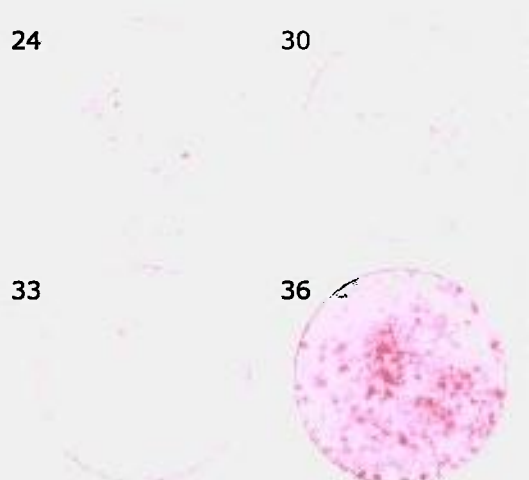


FIGURA 6.5: Placas de cultura celular com clones escolhidos (24, 30, 33 e 36) de células anfotróficas infectadas (GP+ENV+AM12-pLmGHSN) que foram submetidos à titulação viral. Coloração com rodamina B. Nas placas correspondentes aos clones 24, 30 e 33 a diluição foi de 10^{-4} , enquanto para o clone 36 foi de 10^{-3} .

Os resultados da titulação dos clones selecionados se encontram na TAB. 6.2.

TABELA 6.2: Título viral apresentado pelas células anfotróficas infectadas (GP+ENV+AM12-pLmGHSN).

Clone	Título (UFC/mL)	Clone	Título (UFC/mL)
01	$8,3 \times 10^5$	25	$7,4 \times 10^5$
04	$1,0 \times 10^6$	27	$5,9 \times 10^5$
09	$9,3 \times 10^5$	28	$3,3 \times 10^5$
12	$7,3 \times 10^5$	29	$2,0 \times 10^5$
16	$5,8 \times 10^5$	30	$9,2 \times 10^5$
19	$4,1 \times 10^5$	31	$5,0 \times 10^4$
20	$4,6 \times 10^5$	33	$8,0 \times 10^5$
23	$1,0 \times 10^6$	35	$4,3 \times 10^5$
24	$1,6 \times 10^6$	36	$1,2 \times 10^6$

Os clones sinalizados (24, 30, 33 e 36) foram escolhidos para transdução de queratinócitos humanos por apresentarem título adequado (acima de 10^4 UFC/mL) e níveis elevados de expressão de mGH (acima de 10 ng de mGH/ 10^6 células .dia).

Na TAB. 6.3 encontra-se o resumo do desempenho destes clones.

TABELA 6.3: Título viral e nível de expressão de mGH determinados no meio de cultura de células anfotróficas infectadas (GP+ENV+AM12-pLmGHSN), escolhidas para a transdução de queratinócitos humanos.

Clone	Título (UFC/mL)	ng mGH/10 ⁶ células.dia
24	1,6 x 10 ⁶	22,0
30	9,2 x 10 ⁵	33,8
33	8,0 x 10 ⁵	37,5
36	1,2 x 10 ⁶	51,1

6.3 Obtenção de cultura de queratinócitos humanos

A técnica utilizada na cultura primária de queratinócitos humanos foi originalmente descrita por Rheinwald e colaboradores (Rheinwald, 1975). Os queratinócitos foram, portanto, semeados sobre fibroblastos irradiados que serviram de camada de sustentação (*feeder layer*).

Em fase inicial deste trabalho, a metodologia empregada para a cultura celular de queratinócitos humanos se mostrou ineficiente, produzindo uma cultura com alterações morfológicas *in vitro* constantes e baixa sobrevida. Após sucessivas passagens *in vitro*, havia grande diferenciação celular aproximando o estágio de queratinização seguida de morte. Nesta fase focamos nossos estudos no estabelecimento de métodos que permitiram uma cultura de queratinócitos estável quanto à morfologia e duradoura quanto à sobrevida. O protocolo de extração utilizado no laboratório foi alterado diminuindo o tempo de incubação com a enzima tripsina que foi substituída pelo uso da enzima dispase durante 16 horas, o que proporcionou uma maior exposição da camada basal da epiderme. Assim, o método desenvolvido garantiu a obtenção de alto número de células com, provavelmente, uma maior porcentagem de células tronco na cultura celular já que a cultura não apresentou sinais de diferenciação (queratinização e morte celular) durante pelo

menos 20 passagens consecutivas (80 gerações). O rendimento celular obtido nos processos de extração foi em média de 5×10^6 queratinócitos/cm² de fragmento de pele, valor mais elevado que o apresentado na literatura (3×10^6 queratinócitos/cm²) (Green, 1979) e que o obtido em outros trabalhos realizados neste laboratório ($2,5 \times 10^6$ queratinócitos/cm²) (Bellini, 2001).

A nova técnica estabelecida consiste em um protocolo mais simples, com menor tempo de manipulação das células evitando riscos de contaminação e estresse celular, o que pôde ser verificado pelo bom desenvolvimento da cultura. Os queratinócitos foram colocados em cultura e, após sete dias, apresentavam-se bem desenvolvidos e com a morfologia esperada, ou seja, colônias com forma circular composta por células pequenas (Barrandon, 1987). Quando a cultura atingiu cerca de 70% de confluência (por volta de 12 dias), os queratinócitos foram tripsinizados para serem submetidos à transdução.

6.4 Transdução de queratinócitos humanos

Visando a obtenção de um protocolo de transdução que nos fornecesse queratinócitos expressando altos níveis de mGH, três diferentes métodos foram realizados com os clones das células anfotróficas GP+ENV+AM12-pLmGHSN previamente selecionados (clones 24, 30, 33 e 36). A expressão de mGH foi determinada por RIA. Em todos os métodos, placas de controle negativo com queratinócitos não transduzidos foram mantidas em cultura e seus meios igualmente analisados, não sendo detectada expressão de mGH.

Método 1 – contato célula-célula

Os níveis de expressão de mGH obtidos quando foi utilizado o método de transdução baseado no contato célula-célula encontram-se na TAB. 6.4. O ensaio foi repetido três

vezes e a última transdução resultou nos maiores níveis de expressão do mGH. Verificamos um incremento médio de expressão de mGH de 12 vezes na última transdução, período correspondente à obtenção da cultura estável de queratinócitos.

TABELA 6.4: Níveis médios de expressão de mGH determinados no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos em três infecções realizadas pelo método do contato célula-célula.

Clone	Inf. A ($\mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$)	Inf. B ($\mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$)	Inf. C ($\mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$)
24	$0,48 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,20$	$4,40 \pm 1,00$
30	$0,54 \pm 0,24$	$0,16 \pm 0,12$	$3,15 \pm 0,32$
33	$0,75 \pm 0,15$	*ND	$3,00 \pm 0,83$
36	$0,13 \pm 0,10$	$0,72 \pm 0,20$	$4,10 \pm 0,45$

Inf. A: n = 4 placas/clone; Inf. B: n = 4 placas/clone;

Inf. C: n = 10 placas/clone; *ND: não determinado.

Método 2 – sobrenadante + polibreno

Foram detectados níveis de expressão de mGH extremamente baixos quando utilizado o método de transdução pelo sobrenadante contendo partículas virais adicionado de polibreno, conforme verificamos na TAB. 6.5. Dessa forma, a transdução de queratinócitos utilizando esse método foi descontinuada.

TABELA 6.5: Níveis médios de expressão de mGH determinados no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos pelo método do sobrenadante + Polibreno.

Clone	mGH ($\mu\text{g} / 10^6\text{ células.dia}$)
24	ND*
30	$0,02 \pm 0,01$
33	$0,01 \pm 0,01$
36	$0,02 \pm 0,02$

n = 6 placas/clone; *ND: não detectável.

As possíveis razões para esta baixa expressão estão descritas na discussão.

Método 3 – contato célula-célula + polibreno

Os maiores níveis de expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos foram observados com o método de infecção utilizando o contato célula-célula + polibreno, conforme verificamos na TAB. 6.6. Portanto, este método foi escolhido para a continuação dos nossos estudos de incremento da expressão do mGH pelos queratinócitos transduzidos.

TABELA 6.6: Níveis médios de expressão de mGH determinados no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos pelo método do contato célula-célula + polibreno.

Clone	mGH
	($\mu\text{g} / 10^6 \text{células.dia}$)
24	$5,60 \pm 0,87$
30	$4,03 \pm 0,15$
33	$3,93 \pm 0,70$
36	$4,93 \pm 0,45$

n = 6 placas/clone

6.5 Seleção de queratinócitos transduzidos

O uso de geneticina (G418) no meio de cultura celular teve por finalidade a seleção de queratinócitos humanos transduzidos com partículas virais contendo o cDNA do mGH, para um incremento adicional de expressão de mGH. Foram utilizadas diferentes concentrações de G418 para a seleção de queratinócitos transduzidos pelos clones 24 e 36 de células anfitriãs GP+ENV+AM12- pLmGHSN (FIG. 6.6).

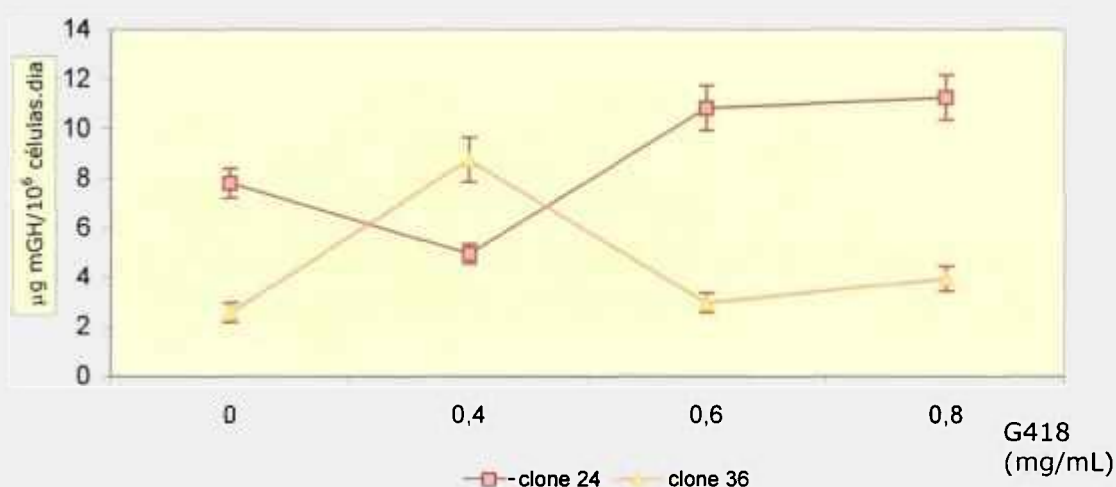


FIGURA 6.6: Níveis de expressão de mGH determinados no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos pelo método do contato célula-célula + polibreno, seguido de seleção com diferentes concentrações de G418. n = 4 placas/clone/concentração.

Houve um aumento de até 3 vezes no nível de expressão de mGH em relação ao controle (2,55 µg mGH/10⁶células.dia) para os queratinócitos transduzidos com o clone 36 usando-se uma concentração de 0,4 mg de G418 por mL (8,75 µg mGH/10⁶células.dia). Queratinócitos transduzidos com o clone 24 tiveram um aumento do nível de expressão de 1,5 vezes usando-se uma concentração de 0,6 (10,83 µg mGH/10⁶células.dia) e 0,8 mg de G418/mL (11,24 µg mGH/10⁶células.dia) em relação ao controle (7,88 µg mGH/10⁶células.dia). Portanto, o melhor incremento de expressão de mGH com seleção foi obtido com diferentes concentrações de G418 para células infectadas por diferentes clones de AM12-pLmGHSN (0,6 mg G418/mL para o clone 24; 0,4 mg G418/mL para o clone 36).

Foi observado também que o uso de uma concentração mais elevada de G418 (0,8 mg/mL) produziu alteração morfológica com presença de maior diferenciação dos queratinócitos transduzidos com os dois clones. Nenhuma alteração morfológica foi observada com o uso de 0,4 ou 0,6 mg de G418/mL.

6.6 Análise comparativa da expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos utilizando dois métodos de transdução, e seleção com G418

A análise comparativa destas médias está apresentada na TAB. 6.7, evidenciando o incremento de expressão de mGH em porcentagem obtido pelo:

- Método 3 (cel+pol) em relação ao método 1 (cel+cel), ou seja, o incremento produzido pelo uso do polibreno;
- Método 3 + seleção com G418 (cel+pol+G418) em relação ao método 3 (cel+pol), ou seja, o incremento produzido pelo uso da G418;
- Método 3 + seleção com G418 (cel+pol+G418) em relação ao método 1 (cel+cel), ou seja, o incremento produzido pelo uso do polibreno somado à G418.

TABELA 6.7: Incremento de expressão de mGH em relação ao uso do polibreno (M 3/M 1), ao uso de G418 (M 3+G418/M 3) e ao uso do polibreno somado à G418.

clone	Incremento de expressão de mGH (%)		
	M 3/M 1	M 3+G418/M 3	M 3+G418/M 1
24	27	101	156
30	28	-	-
33	31	-	-
36	20	79	114

M 1: n = 10 placas/clone, M 3: n = 6 placas/clone, M 3+G418: n = 4 placas/clone.

Foi verificado, assim, que o uso do polibreno no método de transdução produziu um aumento de até 30% na expressão de mGH, enquanto a seleção com G418 de queratinócitos transduzidos produziu, ainda, um aumento de até 100%. O uso do polibreno somado ao uso da seleção por G418 produziu um incremento de até 150% na produção de mGH pelos queratinócitos transduzidos.

Para a confirmação dos incrementos produzidos pelo uso do polibreno, foram feitas novas transduções de queratinócitos utilizando o método M 1 (cel+cel; n=6) ou M 3 (cel+pol; n=6), onde foi verificado um aumento da ordem de 40% na expressão de mGH com uso de polibreno corroborando com resultados anteriores mostrados na tabela 6.7 (~30%).

Da mesma forma, para a confirmação dos incrementos produzidos pela seleção com G418, foram feitas novas transduções de queratinócitos humanos utilizando o método M 3 (cel+pol; n=9) ou M 3 + seleção com G418 (cel+pol+G418; n=9), utilizando o clone 36 de células anfotróficas GP+ENV+AM12-pLmGHSN, onde foi verificado um aumento da ordem de 98% na expressão de mGH após seleção com G418 corroborando com resultados anteriores mostrados na tabela 6.7 (~100%).

Assim, foi estabelecido como método de escolha para a transdução de queratinócitos com o cDNA do mGH, a infecção por contato célula-célula e uso de polibreno + seleção com G418, onde foi verificada a maior expressão média de mGH pelos queratinócitos transduzidos (11,25 µg mGH/10⁶células.dia).

6.7 Avaliação da estabilidade de expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos

A determinação do nível de expressão de mGH secretado por queratinócitos submetidos a três ou quatro passagens celulares demonstrou o caráter estável da transdução de queratinócitos. Nas FIG. 6.7 e 6.8 estão representados os níveis médios de expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos e submetidos a passagens celulares consecutivas para diferentes clones (24, 30, 33 e 36).

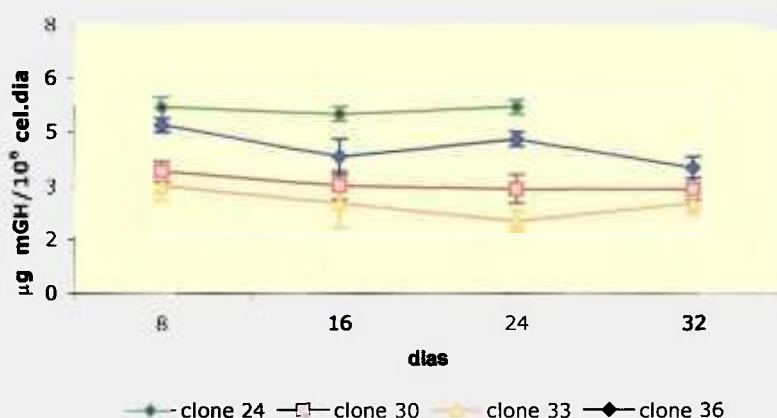


FIGURA 6.7: Níveis médios de expressão de mGH determinados no meio de cultura de queratinócitos transduzidos utilizando o método de infecção do contato célula-célula, durante três ou quatro passagens celulares (n = 8 placas/clone).



FIGURA 6.8: Níveis médios de expressão de mGH determinados no meio de cultura de queratinócitos transduzidos utilizando o método de infecção do contato célula-célula + polibreno, durante três passagens celulares (n = 6 placas/clone).

O coeficiente de variação da expressão de mGH para cada clone das infecções relativas à figuras 6.7 e 6.8 está apresentado nas TAB. 6.8 e 6.9 respectivamente.

TABELA 6.8: Avaliação da estabilidade de expressão de mGH por queratinócitos transduzidos utilizando o método de infecção do contato célula-célula , após 4 passagens celulares.

Clone	Média ± DP ($\mu\text{g mGH}/10^6$ células.dia)	Coeficiente de variação (%)
24	5,13 ± 0,11	2,14
30	3,05 ± 0,23	7,54
33	2,50 ± 0,40	16,00
36	4,07 ± 0,53	13,02

n = 8 placas/clone

TABELA 6.9: Avaliação da estabilidade de expressão de mGH por queratinócitos transduzidos utilizando o método de infecção do contato célula-célula + polibreno , após 3 passagens celulares.

Clone	Média ± DP ($\mu\text{g mGH}/10^6$ células.dia)	Coeficiente de variação (%)
24	5,60 ± 0,87	15,54
30	4,03 ± 0,15	3,72
33	3,93 ± 0,70	17,81
36	4,93 ± 0,45	9,13

n = 6 placas/clone

As concentrações de mGH expresso durante as sucessivas passagens tiveram uma variação entre 2,14 e 17,81%. Portanto, verifica-se que a expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos apresenta uma variação menor que 20% durante sucessivas passagens, evidenciando a estabilidade da infecção.

6.8 **Análise do mGH expresso por epitélio modificado “*in vitro*”**

Para a produção de um epitélio transplantável a partir de queratinócitos modificados foi utilizada a técnica clássica de Barranton (Barranton, 1988) que implica a colocação deste epitélio sobre uma malha de gaze parafinada. Esta técnica foi modificada em nosso laboratório para adaptá-la à utilização para implante em camundongos anões (Bellini, 2001).

O nível de expressão de mGH apresentado *in vitro* pelo epitélio formado por queratinócitos transduzidos por dois clones de células AM12-pLmGHSN foi determinado por RIA, antes e depois de ser destacado da placa de cultura celular.

A produção média de mGH em 8 enxertos analisados foi de 9 a 13 μg /placa de 10 cm de diâmetro para os queratinócitos transduzidos utilizando os clones 33 e 36 respectivamente, antes de serem destacados. Após o uso da enzima dispase, os mesmos enxertos passaram a produzir entre níveis não detectáveis e 0,9 μg de mGH/placa de 10 cm de diâmetro respectivamente. Portanto, foi verificada uma queda de 94 a 100% nos níveis de expressão de mGH pelo enxerto destacado da placa.

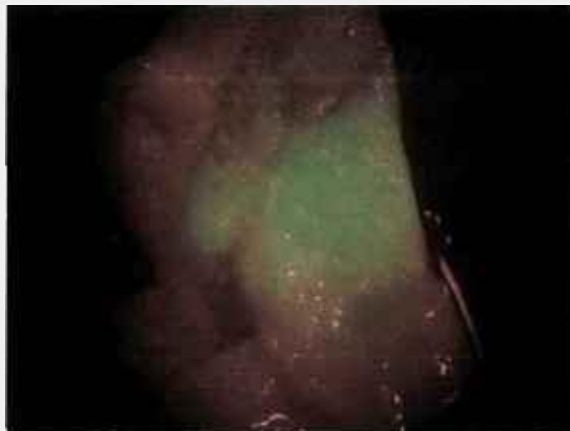
A partir deste resultado, observamos a necessidade da utilização de uma técnica alternativa de preparo de epitélio *in vitro*, que nos forneça um enxerto sobre uma matriz destacável, evitando assim que ocorra uma perda de expressão da proteína de interesse quando os queratinócitos são destacados da placa de cultura. Foi então encontrada na literatura a técnica descrita por Kolodka e colaboradores (Kolodka, 1998), na qual é utilizada uma matriz de colágeno, onde não há, portanto, a necessidade da utilização da enzima dispase para destacar o epitélio formado por queratinócitos transduzidos.

Esta técnica foi realizada durante o estágio da Dra. Cibele Nunes Peroni (orientadora deste projeto) no laboratório do Dr. L. B. Taichman (Stony Brook, NY, EUA). A primeira etapa para a realização desta técnica de implante é o preparo de uma cultura celular organotípica. Vale ressaltar aqui que durante a aprendizagem desta técnica foram utilizados fibroblastos e queratinócitos transduzidos com o gene repórter da GFP (*green fluorescent protein*). Neste modelo de cultura celular é utilizada uma matriz de colágeno embebida em meio de cultura, que funciona tanto como base de sustentação e como fonte de nutrição para os fibroblastos e queratinócitos, após o implante, até que ocorra a vascularização do tecido. A cultura foi realizada sobre um inserto de plástico de 25 mm de diâmetro (Nalge Nunc International, IL, EUA) que possui uma membrana de poro 0,02 μm na parte inferior. Este inserto foi colocado no centro do poço de uma placa de cultura de 6 poços. Ao final do procedimento foi obtido um fragmento circular de consistência e aspecto similar a de uma pele, formado pela matriz de colágeno (colágeno extraído da cauda de rato, Upstate Biotechnology, MA, EUA) contendo fibroblastos humanos modificados com o gene da GFP, sobre a qual encontra-se a camada de queratinócitos modificada com o mesmo gene. Este fragmento de "pele" foi implantado em dois modelos animais, camundongos das linhagens *nude* e *scid*, com a finalidade de verificar se haveria alguma diferença na intensidade de fluorescência obtida, assim como no processo de cicatrização ou rejeição dos implantes. As principais etapas do implante podem ser visualizadas na FIG. 6.9. O fragmento de pele correspondente à região do enxerto (pele humana) circundado por pele de camundongo foi removido dos animais após duas semanas e submetido à análise histológica. Na FIG. 6.10 pode ser observada a fluorescência esverdeada correspondente à região do enxerto onde foi incorporado o gene da GFP após duas semanas do implante. Não foi visualizada diferença entre os enxertos nos dois modelos animais, uma vez que em camundongos *scid* poderia haver algum tipo de rejeição pela interferência do crescimento dos pêlos durante o processo de cicatrização. Em nosso laboratório, será utilizado o camundongo anão imunodeficiente (*little/scid*) para o implante com queratinócitos transduzidos com o gene do mGH.



FIGURA 6.9: Implante do fragmento de “pele” obtido a partir da cultura celular organotípica. Ilustra-se o procedimento num camundongo *nude*, com as principais etapas: A) obtenção do fragmento construído num inserto de plástico; B) acomodação do fragmento sobre a região dorsal do animal onde foi retirada a pele numa região circular correspondente ao tamanho do enxerto (aproximadamente 12mm de diâmetro); C) colocação da gaze vaselinizada sobre o enxerto; D) colocação do curativo (*band-aid*).

A



B

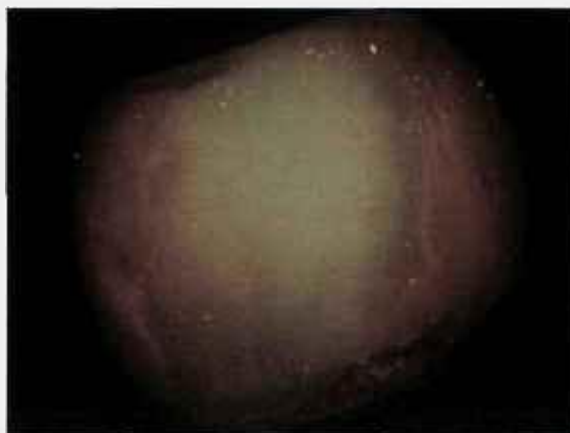


FIGURA 6.10: Análise histológica e visualização da fluorescência esverdeada emitida pelos enxertos retirados de camundongos *nude* (A) ou *scid* (B), previamente implantados com queratinócitos e fibroblastos humanos modificados com o gene da GFP.

6.9 Determinação da meia-vida circulatória do hGH e do mGH no camundongo normal (C57BL) e anão (little/little)

Após injeção de solução salina contendo mGH ou hGH, foram determinados os níveis dos hormônios no soro dos camundongos por radioimunoensaio e a meia-vida dos mesmos foi calculada. Nos experimentos foram utilizados camundongos C57BL ou *little/little* e diferentes doses de hGH e mGH. Os valores de meia-vida ($t_{1/2}$) circulatória do hGH ou do mGH obtidos encontram-se na TAB. 6.10.

TABELA 6.10: Meia-vida circulatória do hGH ou do mGH obtida após inoculação desses hormônios em camundongos C57BL ou *little/little*.

Camundongo	Dose de hGH ou mGH injetada (μg)	$t_{1/2}$ (min)
C57BL	0,1 (hGH)	11
<i>little/little</i>	5,0 (hGH)	19
<i>little/little</i>	1,0 (mGH)	40
<i>little/little</i>	1,0 (mGH)	55

Verificou-se nestes experimentos preliminares uma tendência para que a meia-vida circulatória do hGH em camundongos seja menor que a do mGH, indicando que a utilização de um sistema homólogo (implante de queratinócitos transduzidos com o mGH em camundongos) pode resultar na obtenção de maiores níveis circulantes da proteína de interesse por períodos mais prolongados quando comparado com um sistema heterólogo (implante de queratinócitos transduzidos com o hGH em camundongos).

6.10 Caracterização do mGH expresso pelos queratinócitos transduzidos

Foi realizada uma análise qualitativa e de identidade do mGH produzido por queratinócitos transduzidos utilizando-se duas metodologias: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de *Western blotting*, e cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC) combinada a uma determinação imunológica por radioimunoensaio (RIA).

6.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting*

O meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para a separação e verificação da proteína de interesse (mGH). A título de comparação, o mesmo foi feito paralelamente com meio coletado da cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do hGH. No gel de SDS, apresentado na FIG. 6.11, verifica-se que os meios analisados expressam proteínas de pesos moleculares idênticos aos respectivos padrões de mGH e hGH utilizados.

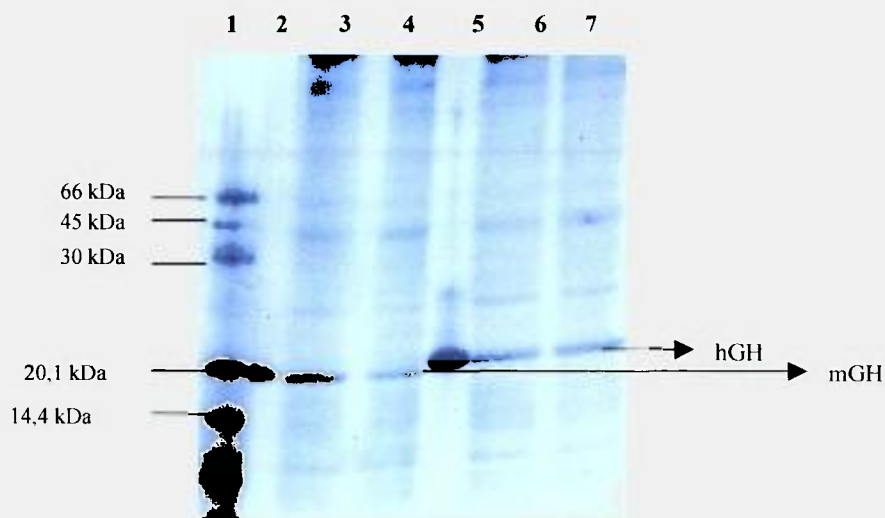


FIGURA 6.11: SDS-PAGE: (1) marcadores de peso molecular (5 μ g): 66 kDa – soroalbumina bovina; 45 kDa – ovoalbumina; 30 kDa – anidrase carbônica; 20,1 kDa – inibidor de tripsina; 14,4 kDa – α -lactalbumina (2) preparação padrão de hormônio de crescimento de camundongo (1 μ g): 21 kDa; (3 e 4) meios de cultura de queratinócitos transduzidos com gene do mGH (140 μ L); (5) preparação padrão de hormônio de crescimento humano (2 μ g): 22 kDa; (6 e 7) meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do hGH (140 μ L).

A seguir, foi realizada a análise por *Western blotting* do meio de cultura coletado de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH. Na autoradiografia (FIG. 6.12) verifica-se que o mGH expresso por esses queratinócitos apresenta atividade imunológica e peso molecular idênticos ao padrão de hormônio de crescimento de camundongo.

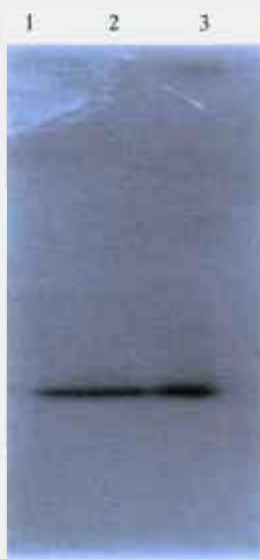


FIGURA 6.12: Análise por *Western blotting* do meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH. (1 e 2) meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH (140 μ L); (3) preparação padrão do hormônio de crescimento de camundongo (1 μ g).

6.10.2 Análise em HPSEC associada a RIA

Foram injetados 200 μ L de meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH ou 10 μ L (5 μ g) de padrão de mGH, em aparelho HPLC, para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC). A determinação por radioimunoensaio (RIA) do conteúdo de mGH nas frações de 1 mL coletadas durante a cromatografia comprovou que o hormônio secretado possui o mesmo tempo de retenção que o padrão de mGH ($t_R = 18,68$ min), evidenciando a identidade entre ambos (FIG. 6.13).

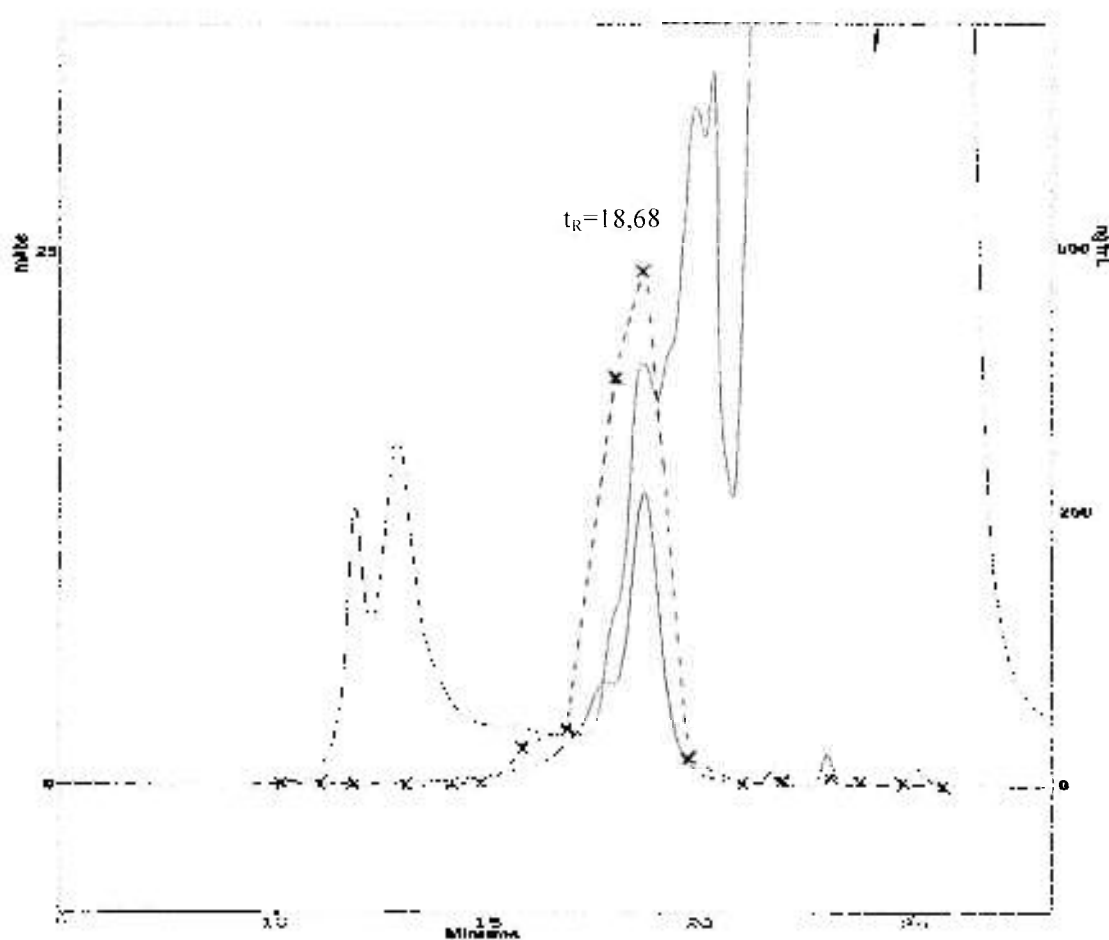


FIGURA. 6.13: Cromatogramas obtidos por HPSEC. (—) preparação padrão do hormônio de crescimento de camundongo (5 μ g) com o respectivo tempo de retenção ($t_R = 18,68$ min). (---) 200 μ L de meio de cultura de queratinócitos transduzidos com o gene do mGH. (-x-x-) mGH determinado por RIA (ng/mL) nas frações de meio de cultura coletadas. mAbs, absorbância monitorada a 220 nm.

A utilização destas técnicas permitiu, portanto, a comprovação de que o mGH expresso pelos queratinócitos transduzidos com o gene do mGH é idêntico ao padrão do hormônio de crescimento de camundongo quanto ao peso molecular e atividade imunológica.

7 Discussão

A expressão de genes em populações de células apropriadas depende de eficientes métodos de transferência do gene de interesse para a célula alvo. Um modo particularmente eficiente e seguro de transferência de genes é o uso de vetores retrovirais. A escolha do vetor pLXSN foi em razão deste já ter sido aprovado para uso em células humanas, com obtenção de altos títulos, altos níveis de expressão do gene de interesse e estabilidade de integração (Salvatori, 1993). A construção do vetor de expressão retroviral pLmGHSN foi altamente eficiente proporcionando a obtenção dos mais altos níveis de expressão do hormônio de crescimento de camundongo (mGH) por queratinócitos humanos primários já relatados ($11,25 \mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$).

O meio das células empacotadoras ecotróficas GP+E86 transfectadas transientemente apresentou $10,5 \text{ ng mGH/mL}$, resultado comparável ao obtido anteriormente na transfecção destas células com o gene do hormônio de crescimento humano, onde foram detectados $7,2 \text{ ng hGH/mL}$ (Bellini, 2001). Após infecção de células empacotadoras da linhagem anfotrófica GP+ENV+AM12, foram obtidos altos níveis de expressão *in vitro* variando de 22 a $51 \text{ ng mGH}/10^6 \text{ células.dia}$ e altos títulos virais de $9,5 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^6 \text{ ufc/mL}$. Títulos da ordem de 10^6 ufc/mL são obtidos correntemente pelos vetores disponíveis. A obtenção de altos títulos é essencial para o sucesso da transdução celular, principalmente quando se pretende transduzir um alto número de células. Os títulos dos vetores retrovirais obtidos por transfecção das células empacotadoras são pelo menos 20 vezes mais baixos que os obtidos por transdução, fazendo o uso de duas linhagens consecutivas de células empacotadoras útil na obtenção de altos títulos virais (Miller, 1989). Dessa maneira, a introdução do vetor em células de empacotamento viral ecotróficas e a utilização das partículas virais liberadas por estas células para a infecção das células de empacotamento anfotróficas

possibilitaram a obtenção de altos títulos virais permitindo a infecção de um grande número de queratinócitos que passaram a produzir e secretar o mGH.

Outro motivo para a escolha deste sistema de transporte de DNA foi a característica defectiva do vetor retroviral, conferindo uma terapia mais segura. Para a produção de vetores retrovirais defectivos, células empacotadoras têm sido desenvolvidas para fornecer todas as proteínas virais, mas não transmitir os RNAs que codificam essas funções. Os retrovírus produzidos por essas células podem transduzir células, mas não podem se replicar (Coffin, 1997).

O sistema de secreção de proteínas recombinantes em um modelo de terapia gênica deve usar um tipo de célula que possa ser facilmente isolada do doador, cultivada e amplificada, transduzida com o gene de interesse e convenientemente reimplantada no organismo do hospedeiro (Bellini, 2001). Queratinócitos humanos são potencialmente atraentes veículos de transporte de produtos de transgenes porque podem ser transferidos para a pele humana por procedimentos de enxerto relativamente simples. Outra vantagem a ser considerada é que a epiderme modificada pode ser facilmente retirada do paciente em caso de término do tratamento ou de haver uma resposta imune. Deve-se levar em consideração que, além de executável, o sistema de terapia gênica seja financeiramente viável, onde se foca a utilização de células facilmente manipuláveis.

Dessa forma, nesse trabalho optou-se pelo uso de queratinócitos humanos para o desenvolvimento de um modelo de terapia gênica. A escolha destas células é interessante para o uso de modelos sistêmicos de terapia já que estas células são naturalmente secretoras de fatores que atingem a circulação sanguínea. A técnica utilizada na cultura primária de queratinócitos humanos foi originalmente descrita por Rheinwald e colaboradores (Rheinwald, 1975). Os queratinócitos foram, portanto, semeados sobre fibroblastos irradiados que serviram de camada de sustentação. A

literatura relata que os fibroblastos irradiados são de fundamental importância na cultura de células epiteliais porque, além de servirem como suporte para ancoragem dos queratinócitos, também secretam proteínas e fatores de crescimento que facilitam a adesão destes à placa e estimulam a proliferação destas células. Segundo Green e colaboradores (Green, 1979), os fibroblastos irradiados também são um fator de inibição de proliferação de outros fibroblastos provenientes da biópsia do doador de pele.

Apesar de ter condições estabelecidas, a cultura de queratinócitos representou uma grande dificuldade em nosso trabalho. Inicialmente, a morfologia da cultura celular e sua sobrevivência *in vitro* não foram satisfatórias com o uso de protocolos retirados de trabalhos anteriores. Após sucessivas passagens, havia uma grande diferenciação celular aproximando o estágio de queratinização e morte. Dificuldades na obtenção de uma cultura de queratinócitos estável já tinham sido citadas em recentes trabalhos desenvolvidos neste laboratório (Mathor, 1994; Bellini, 2001). É evidente que qualquer protocolo para uso de queratinócitos requer um ambiente de cultura que permita a manutenção de células tronco. Assim, tornou-se prioritária a busca de soluções para o estabelecimento de protocolos que reproduzissem tanto a estabilidade da cultura durante os experimentos, como os níveis de expressão do transgene de interesse pelos queratinócitos modificados. Baseadas em atualização bibliográfica e aconselhamento pessoal com o grupo de trabalho do Dr. Lorne B. Taichman (Stony Brook, NY, EUA, várias metodologias usadas neste trabalho foram alteradas e significaram um avanço fundamental para este projeto onde temos agora protocolos estabelecidos que resultam em um alto desempenho da cultura de queratinócitos. A alteração do protocolo de extração de queratinócitos com maior exposição das células da camada basal da epiderme mediante o uso da enzima dispase viabilizou a obtenção de 20 passagens celulares, com 80 ciclos de replicação, sem alterações morfológicas como queratinização. A provável razão para a passagem sem diferenciação visível é a extração de queratinócitos de uma camada mais rica em células tronco, as quais têm

um papel fundamental na sobrevivência da cultura. Além disso, neste protocolo, o contato das células com a tripsina acontece durante um tempo menor, diminuindo o estresse celular.

Sabendo que a grande dificuldade da cultura de queratinócitos é evitar a diferenciação, vários autores utilizam um meio de cultura menos rico em soro fetal bovino (SFB), propiciando a manutenção de células indiferenciadas por mais tempo. Dunnwald e colaboradores (Dunnwald, 2001) preparam um meio de cultura a 2% SFB enquanto o nosso grupo preparava um meio a 10% SFB. Similarmente, o grupo do Dr. L.B. Taichman (comunicação pessoal) prepara um meio a 5% SFB. Há publicação ainda que cite a utilização de meio sem soro para a cultura de queratinócitos (Pfutzner, 1999). A redução do SFB de 10 para 4% neste projeto forneceu uma cultura morfolologicamente estável com um tempo de crescimento adequado. Adicionalmente, foram reduzidas pela metade as concentrações de penicilina, estreptomicina e glutamina e retirados suplementos não utilizados por diversos autores (triiodotironina e transferrina). O novo preparo do meio de cultura passou a contar ainda com a utilização de um tampão (HEPES). Essas alterações visaram propiciar um meio menos rico e estável, com o qual foi visualizada uma nítida melhora na performance da cultura.

Outros estudos foram desenvolvidos com a finalidade de descobrir a existência de um fator determinante que estivesse prejudicando a cultura, quanto ao crescimento e morfologia das colônias. Foram testadas diferentes linhagens celulares para a camada de sustentação dos queratinócitos (NIH-3T3 e uma sublinhagem NIH-3T3/J2); e diferentes fontes de pele para a obtenção de células (pele proveniente de mamoplastia ou de prepúcio de neonato). Não foi observada alteração de cultura significativa no estudo destes últimos parâmetros e verificou-se assim que os fatores que mais influenciaram a performance da cultura celular foram o método de extração das células e a composição do meio de cultura celular.

A identificação de células tronco (*stem cells*) baseada no fenótipo celular tem sido amplamente estudada e utilizada visando seu isolamento da mistura de células da pele (Fenjves, 1994a; Kolodka, 1998; Dunnwald, 2001). Ensaios para a identificação de células tronco não foram focados em nosso projeto, pois além de necessitarem um conhecimento ainda não obtido em nosso laboratório, seriam inviáveis ao tempo proposto. Entretanto a ausência de estímulos à diferenciação nos permitiu manter a cultura celular sem alterações morfológicas durante pelo menos 80 ciclos de replicação indicando a existência de células tronco na cultura.

Como os retrovírus requerem células que estejam em mitose para que haja integração do provírus, a transdução de uma cultura de queratinócitos resultará, preferencialmente, na transdução de células amplificadoras. Entretanto, dados da literatura demonstram a expressão de transgenes por longo período em queratinócitos, sugerindo a transdução eficiente de células tronco. Segundo Jones e colaboradores (Jones, 1995), uma população de queratinócitos que expresse um transgene por pelo menos 5 ciclos de replicação indica que o gene se integrou em células tronco. No nosso trabalho, os níveis de expressão de mGH se mantiveram constantes por pelo menos 32 dias, correspondendo a 16 ciclos de replicação. A estabilidade da cultura de queratinócitos se manteve durante todos os experimentos de transdução.

Com as dificuldades de cultura celular superadas, o estudo de metodologias de transdução para aumento da expressão de mGH pelos queratinócitos humanos voltou a ser o foco do trabalho. Teoricamente, o sobrenadante das células empacotadoras AM12-pLmGHSN adicionado ao polibreno (método 2) para uso em queratinócitos deveria resultar em uma transdução produtiva, pois este reagente aumenta a permeabilidade da membrana celular facilitando a entrada da partícula retroviral na célula. Porém, foram obtidos níveis muito baixos de expressão de mGH pelos queratinócitos transduzidos com a utilização deste método. Esse protocolo pode ser

ideal em trabalhos que utilizem um vetor retroviral capaz de ser concentrado por ultracentrifugação, como é o caso do vetor VSV-G que é também derivado do vírus da leucemia murina de Moloney, mas que teve a glicoproteína de seu envelope viral trocada pela glicoproteína do vírus da estomatite vesicular. O uso desse retrovírus tem produzido títulos da ordem de 10^9 ufc/mL após ultracentrifugação (Burns, 1993; Robbins, 1998). Já que neste método o momento da exposição do retrovírus à célula alvo é único, ou seja, a transdução ocorre apenas durante o tempo de contato do sobrenadante com o queratinócito, um título viral alto é um fator determinante para o sucesso da transdução (Burns, 1993). Vários métodos de concentração têm sido desenvolvidos incluindo o uso de centrifugação retroviral, onde pode-se alcançar um aumento do título viral em até 20 vezes (Zelenock, 1997). Por outro lado, a fragilidade do envelope viral limita a habilidade de concentrar alguns vetores retrovirais podendo resultar em perda da infectividade (John M. Coffin, 1997). A tentativa de concentrar o vetor pLXSN por ultracentrifugação geralmente resulta em mínimo aumento da concentração viral e ainda com perda da infectividade resultando em menor título (Burns, 1993). Como neste projeto não foi utilizada, por exemplo, uma cotransfecção de um vetor contendo a glicoproteína VSV-G para tornar o nosso vetor retroviral apto à ultracentrifugação, optamos por descontinuar a utilização deste método.

Os experimentos de transdução realizados demonstram que o método do contato entre a célula empacotadora produtora de partículas retrovirais e a célula alvo (método 1) foi altamente eficiente, pois mantém o contato das partículas retrovirais e a célula alvo por aproximadamente 8 dias, sendo que um título de 10^6 ufc/mL foi suficiente neste protocolo. Assim, com o uso do contato célula-célula obtivemos uma alta expressão de mGH pelos queratinócitos modificados *in vitro* ($\sim 4,40 \mu\text{g mGH}/10^6 \text{células.dia}$).

Métodos que facilitem a transdução viral são importantes na maximização da eficiência da transferência gênica. Como já mencionado anteriormente, o polibreno é usado para

facilitar a entrada dos retrovírus na célula alvo. Apesar da obtenção de altos níveis de expressão utilizando o contato célula-célula, a utilização deste método com adição de polibreno (método 3) resultou em níveis ainda mais elevados de expressão de mGH com incrementos de aproximadamente 30% ($\sim 5,60 \mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$). A adição de polibreno na cocultura de células, apesar de não citada na literatura, em nosso trabalho representou uma maneira simples de melhoramento da expressão do transgene, e foi escolhido como método de transdução de células alvo em nosso laboratório.

O uso de métodos de seleção é considerado uma vantagem da terapia gênica *ex vivo* (Greenhalgh, 1994). A seleção com G418 de queratinócitos transduzidos representou um incremento, na média, de aproximadamente 100% do nível de expressão de mGH comparado com células não selecionadas. Diferentes opiniões são relatadas na literatura quanto ao uso de G418, sendo que alguns autores citam que agentes de seleção podem induzir diferenciação das células (Ghazizadeh, 1998) enquanto outros defendem as práticas de seleção (Chen, 1995; Kolodka, 1998; White, 1998). Nesse trabalho, a utilização de G418 não mostrou induzir tal diferenciação nas concentrações de até 0,6 mg G418/mL.

O vetor pLXSN já foi utilizado em nosso laboratório para a expressão de hGH em queratinócitos transduzidos, com a obtenção de elevados níveis de secreção *in vitro* ($\sim 7 \mu\text{g hGH}/10^6\text{células.dia}$) (Bellini, 2001). O estudo de técnicas alternativas de transdução de queratinócitos humanos resultou em um protocolo ainda mais eficiente onde obtivemos uma expressão de aproximadamente $11,25 \mu\text{g mGH}/10^6\text{células.dia}$ utilizando o método do contato célula-célula + polibreno e posterior seleção com G418. Além de ser a primeira vez que o mGH é expresso em queratinócitos transduzidos, os níveis de secreção *in vitro* obtidos por estas células foram bem superiores aos encontrados na literatura em trabalhos similares utilizando o hGH. Morgan e colaboradores (Morgan, 1987) obtiveram $0,072 \mu\text{g hGH}/10^6\text{células.dia}$ com a

cultura de queratinócitos humanos primários transduzidos e selecionados com geneticina (0,6 mg G418/mL) utilizando um vetor baseado no promotor LTR; enquanto Jensen e colaboradores (Jensen, 1994) obtiveram aproximadamente 0,7 µg hGH/10⁶células.dia utilizando um vetor baseado no promotor SV40.

Em nosso laboratório, ensaios preliminares indicaram que o destacamento do epitélio modificado da placa de cultura celular parece contribuir para a perda de expressão pelos queratinócitos. Embora tenhamos obtido queratinócitos transduzidos com expressão de altos níveis de mGH *in vitro* e estáveis quando mantidos em cultura (sem sinais de senilidade), a análise da expressão do enxerto após ser destacado da placa de cultura celular mostrou uma queda da ordem de 94 a 100% do nível de expressão de mGH pelos queratinócitos, o que deve comprometer os níveis de expressão *in vivo*. Apesar de não entender a razão, Teumer e colaboradores (Teumer, 1990) já tinham citado a queda de até 83% da expressão de hGH após destacar o epitélio modificado da placa de cultura. O uso de uma técnica que mantivesse *in vivo* a estrutura do epitélio produzido *in vitro* poderia significar uma maior reprodutibilidade dos resultados. Com isso em mente, estamos estudando a alteração da técnica de construção do enxerto que se refletirá em uma alteração na técnica cirúrgica, etapa esta que deverá ser realizada em um projeto contíguo. Em seu trabalho, Krueger e colaboradores (Krueger, 1999b) concluíram que a expressão do transgene e sobrevivência de fibroblastos modificados é dependente da presença de uma matriz de suporte para as células, evitando o encolhimento do epitélio destacado. Segundo o mesmo autor, é necessário que haja a persistência da forma da matriz *in vivo*, enquanto que a maturação da matriz *in vitro* por duas semanas ou mais contribui para o aumento da expressão *in vivo*. White e colaboradores (White, 1998) também citam a importância da matriz na expressão dos queratinócitos *in vivo*. O problema de encolhimento do epitélio destacado vai além do momento da transferência do implante, sendo verificado também em cortes histológicos retirados do animal dias após a cirurgia (Kolodka, 1998). No lugar de construir um enxerto baseado puramente

em queratinócitos transduzidos produzindo uma camada muito fina e frágil, um protocolo alternativo sugere sua construção sobre uma matriz formada por fibroblastos e colágeno capaz de substituir por completo a pele do animal na região do implante (Kolodka, 1998). Neste protocolo, o enxerto formado possui uma estrutura mais sólida devido ao maior número de camadas celulares e mantém a mesma morfologia durante a transferência do implante para o animal, o que poderia também evitar, ou pelo menos diminuir, o encolhimento que ocorre após a cirurgia.

Proteínas de peso molecular maiores que 57 kDa já foram transportadas da epiderme para a circulação sanguínea de camundongos (Gerrard, 1993). O hormônio de crescimento de camundongo com peso molecular de 21 kDa é, portanto, uma proteína que poderia ser facilmente transportada para a circulação, quando expressa pelos queratinócitos. Na caracterização do mGH expresso pelos queratinócitos, obteve-se uma proteína de aproximadamente 21 kDa, similar ao obtido por Al-Hendy e colaboradores (al-Hendy, 1995) em análise por *Western blotting*, e também similar ao mGH purificado da hipófise de camundongos pelo *National Hormone and Pituitary Program of NIADDK* (Torrance, EUA) indicando que não ocorreram erros no processo traducional do mGH secretado pelos queratinócitos humanos. Além do *Western blotting*, a análise por HPLC combinada ao RIA confirmou o peso molecular e a identidade imunológica do mGH expresso pelos queratinócitos humanos.

Um dos objetivos deste trabalho foi a comparação da eficiência entre um sistema homólogo (mGH em camundongo) e um sistema heterólogo (hGH em camundongo), ou seja, um estudo quanto à duração do nível de expressão no modelo animal. Modelos de terapia gênica têm sido desenvolvidos usando pele humana reconstituída *in vitro* e implantada em camundongos imunodeficientes. Esse estudo permite a regeneração da pele humana que pode corrigir uma patologia em um modelo animal que simule uma doença humana, mas não permite informação sobre a resposta imune que a expressão do transgene pode causar. Modelos animais são freqüentemente

usados para a avaliação da atividade biológica de proteínas humanas, entretanto anticorpos de camundongos têm sido identificados como inibidores, e em alguns casos parecem aumentar a atividade biológica de hormônios humanos (Holder, 1985). A possível diferença de efeito biológico existente entre o sistema homólogo e heterólogo foi estudada verificando-se o parâmetro de meia-vida circulatória dos dois hormônios em camundongos. Segundo Palmiter e colaboradores (Palmiter, 1982), a meia-vida circulatória do hGH em camundongos é de 4 a 20 minutos enquanto Teumer e colaboradores citam (Teumer, 1990) uma meia-vida de 4 minutos. Em nosso trabalho a meia vida foi determinada para hGH foi de 11 a 19 minutos enquanto a meia vida do próprio mGH em camundongos foi verificada ser de 40 a 55 minutos, indicando, portanto que o hGH seria metabolizado mais rapidamente do que o mGH em camundongos. Estes primeiros resultados nos levam a acreditar que a utilização de um sistema homólogo (implante de queratinócitos transduzidos com o mGH em camundongos) possa resultar na obtenção de maiores níveis circulantes da proteína de interesse por períodos mais prolongados, o que representa um desafio atual quando se trata de modelo de terapia gênica baseada na utilização de queratinócitos. Espera-se, portanto, que o modelo homólogo possa fornecer resultados mais conclusivos também na obtenção de correção fenotípica do camundongo anão quando comparado aos resultados obtidos para o sistema heterólogo estudado em nosso laboratório (Bellini, 2001) cujos níveis circulantes já foram mencionados na introdução.

Os resultados deste trabalho contribuíram assim para a construção de um modelo de terapia gênica onde foram obtidos altos níveis de expressão *in vitro* da proteína de interesse e informações preliminares sobre o comportamento desse hormônio em um modelo animal adequado para o estudo proposto. As próximas etapas deste trabalho devem focar primeiramente a construção de uma matriz celular organotípica de expressão e a seguir utilizar o epitélio obtido para o implante em camundongos anões imunodeficientes (little/scid).

Paralelamente sugere-se que a habilidade de identificar e isolar células tronco epidérmicas, um importante pré-requisito para o desenvolvimento de terapia gênica cutânea, deva ser levada em consideração.

Embora altos níveis de expressão sejam requeridos para uma terapia sistêmica, para o tratamento de doenças metabólicas aconselha-se também a regulação da expressão do transgene. Deve-se ter em mente, portanto, a importância da utilização de promotores induzíveis que regulem essa expressão (Taichman, 1999). Novamente verifica-se a vantagem do uso da terapia cutânea uma vez que permitiria a aplicação tópica de agentes farmacológicos que resultariam em efeitos biológicos sistêmicos reguláveis, sendo, portanto, necessários mais estudos em direção ao desenvolvimento de vetores contendo, por exemplo, promotores passíveis de regulação (Mathor, 1994).

A dificuldade de obtenção de protocolos efetivos de terapia gênica cutânea a nível sistêmico, que forneçam expressões a longo prazo do transgene de interesse, tem sido atribuída principalmente à diferenciação terminal dos queratinócitos transduzidos; morte dos queratinócitos devido às técnicas de implante e ausência de transdução de células tronco (White, 1998). Infelizmente é difícil saber qual dos fatores é mais crítico devido à grande variação dos protocolos existentes. Por outro lado, devido a todas as vantagens já mencionadas em relação à terapia gênica cutânea, e a todos os progressos no sentido de entender e solucionar os problemas ainda existentes, acreditamos que a pele deva ser brevemente utilizada de modo efetivo como alvo de terapia gênica sistêmica.

8 Conclusões

- O vetor retroviral pLXSN se mostrou altamente eficiente para a transferência gênica, levando à obtenção dos maiores valores de secreção *in vitro* de uma forma de GH em queratinócitos humanos primários transduzidos.
- Pela primeira vez, queratinócitos humanos foram geneticamente modificados com o gene do mGH e foram capazes de secretar um hormônio murino de peso molecular e comportamento imunológico idênticos ao do mGH pituitário.
- Os protocolos de extração e cultura de queratinócitos estabelecidos provaram ser eficientes na promoção de uma cultura celular estável que produziu uniformidade de resultados.
- A estabilidade da expressão durante 16 ciclos de replicação (80 gerações) sugere que houve transdução de células tronco.
- A técnica clássica de preparo do enxerto com queratinócitos geneticamente modificados usada em trabalhos anteriores é, provavelmente, um dos fatores responsáveis pela baixa concentração de hormônio na circulação de camundongos.
- Os resultados obtidos até agora referentes ao desenvolvimento de um modelo animal para terapia gênica *ex vivo* indicam que a utilização de um sistema homólogo deve fornecer informações mais seguras que a utilização de um sistema heterólogo.

9 Referências bibliográficas

AL-HENDY, A., HORTELANO, G., TANNENBAUM, G. S. and CHANG, P. L. Correction of the growth defect in dwarf mice with nonautologous microencapsulated myoblasts - an alternate approach to somatic gene therapy. *Hum Gene Ther*, v. 6 (2), p. 165-75, 1995.

ALITALO, K., KUISMANEN, E., MYLLYLÄ, R., KIISTALA, U., ASKO-SELJAVAARA, S. and VAHERI, A. Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. *J Cell Biol*, v. 94 (3), p. 497-505, 1982.

BARRANDON, Y. and GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84 (8), p. 2302-6, 1987.

BARRANDON, Y., LI, V. and GREEN, H. New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. *J Invest Dermatol*, v. 91 (4), p. 315-8, 1988.

BELLINI, M. H. (2001). **Hormônio de crescimento humano na circulação de camundongos anões imunodeficientes após implante de queratinócitos humanos geneticamente modificados.** São Paulo, (Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina).

BLAESE, R. M., CULVER, K. W., MILLER, A. D., CARTER, C. S., FLEISHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTOSHEV, P. and ET AL. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, v. 270 (5235), p. 475-80, 1995.

BOUCHER, R. C., KNOWLES, M. R., JOHNSON, L. G., OLSEN, J. C., PICKLES, R., WILSON, J. M., ENGELHARDT, J., YANG, Y. and GROSSMAN, M. Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity.

- The University of North Carolina at Chapel Hill. ***Hum Gene Ther***, v. 5 (5), p. 615-39, 1994.
- BUNTING, K. D., SANGSTER, M. Y., IHLE, J. N. and SORRENTINO, B. P. Restoration of lymphocyte function in Janus kinase 3-deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. ***Nat Med***, v. 4 (1), p. 58-64, 1998.
- BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. ***Anal Biochem***, v. 112 (2), p. 195-203, 1981.
- BURNS, J. C., FRIEDMANN, T., DRIEVER, W., BURRASCANO, M. and YEE, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, v. 90 (17), p. 8033-7, 1993.
- CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J. L., BOUSSO, P., DEIST, F. L. and FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. ***Science***, v. 288 (5466), p. 669-72, 2000.
- CHEN, B. F., CHANG, W. C., CHEN, S. T., CHEN, D. S. and HWANG, L. H. Long-term expression of the biologically active growth hormone in genetically modified fibroblasts after implantation into a hypophysectomized rat. ***Hum Gene Ther***, v. 6 (7), p. 917-26, 1995.
- CHENG, T. C., BEAMER, W. G., PHILLIPS, J. A., 3RD, BARTKE, A., MALLONEE, R. L. and DOWLING, C. Etiology of growth hormone deficiency in little, Ames, and Snell dwarf mice. ***Endocrinology***, v. 113 (5), p. 1669-78, 1983.
- COFFIN, J. M., HUGHES, S. H. and VARMUS, H. E. Retroviruses at the national center of biotechnology information - Principles of Retroviral Vector Design. v., 1997.

- CULVER, K. W., ANDERSON, W. F. and BLAESE, R. M. Lymphocyte gene therapy. **Hum Gene Ther**, v. 2 (2), p. 107-9, 1991.
- DALMORA, S. O., J.E.; AFFONSO, R.; GINDO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr. A.**, v. 782 p. 199-210, 1997.
- DANI, S. U. Vetores para terapia gênica. **Revista biotecnologia - ciência e desenvolvimento** (http://www.biotecnologia.com.br/bio12/12_f.html), v., 1998.
- DE LUCA, M., ALBANESE, E., BONDANZA, S., MEGNA, M., UGOZZOLI, L., MOLINA, F., CANCEDDA, R., SANTI, P. L., BORMIOLI, M., STELLA, M. and ET AL. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. **Burns**, v. 15 (5), p. 303-9, 1989.
- DENG, H., LIN, Q. and KHAVARI, P. A. Sustainable cutaneous gene delivery. **Nat Biotechnol**, v. 15 (13), p. 1388-91, 1997.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F. and RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16 (13), p. 6127-45, 1988.
- DUNNWALD, M., TOMANEK-CHALKLEY, A., ALEXANDRUNAS, D., FISHBAUGH, J. and BICKENBACH, J. R. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. **Exp Dermatol**, v. 10 (1), p. 45-54, 2001.
- FENJVES, E. S. Approaches to gene transfer in keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 103 (5 Suppl), p. 70S-75S, 1994a.
- FENJVES, E. S., SMITH, J., ZARADIC, S. and TAICHMAN, L. B. Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy. **Hum Gene Ther**, v. 5 (10), p. 1241-8, 1994b.

- FENJVES, E. S., YAO, S. N., KURACHI, K. and TAICHMAN, L. B. Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 106 (3), p. 576-8, 1996.
- FISHER, K. J., CHOI, H., BURDA, J., CHEN, S. J. and WILSON, J. M. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. **Virology**, v. 217 (1), p. 11-22, 1996.
- FONTES, P. A. and THOMSON, A. W. Stem cell technology. Interview by Abi Berger. **Bmj**, v. 319 (7220), p. 1308, 1999.
- GERRARD, A. J., HUDSON, D. L., BROWNLEE, G. G. and WATT, F. M. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. **Nat Genet**, v. 3 (2), p. 180-3, 1993.
- GHAZIZADEH, S., HARRINGTON, R., GARFIELD, J. and TAICHMAN, L. B. Retrovirus-mediated transduction of porcine keratinocytes in organ culture. **J Invest Dermatol**, v. 111 (3), p. 492-6, 1998.
- GHAZIZADEH, S. and TAICHMAN, L. B. Virus-mediated gene transfer for cutaneous gene therapy. **Hum Gene Ther**, v. 11 (16), p. 2247-51, 2000.
- GREEN, H., KEHINDE, O. and THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76 (11), p. 5665-8, 1979.
- GREENHALGH, D. A., ROTHNAGEL, J. A. and ROOP, D. R. Epidermis: an attractive target tissue for gene therapy. **J Invest Dermatol**, v. 103 (5 Suppl), p. 63S-69S, 1994.
- GROBHANS, H. Gene therapy - when a simple concept meets a complex reality. **Func Integr Genomics**. v. 1: 142-145, 2000.

- GUNNING, P., LEAVITT, J., MUSCAT, G., NG, S. Y. and KEDES, L. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, v. 84 (14), p. 4831-5, 1987.
- HEARTLEIN, M. W., ROMAN, V. A., JIANG, J. L., SELLERS, J. W., ZULIANI, A. M., TRECO, D. A. and SELDEN, R. F. Long-term production and delivery of human growth hormone in vivo. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, v. 91 (23), p. 10967-71, 1994.
- HERZOG, R. W., HAGSTROM, J. N., KUNG, S. H., TAI, S. J., WILSON, J. M., FISHER, K. J. and HIGH, K. A. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, v. 94 (11), p. 5804-9, 1997.
- HOLDER, A. T., ASTON, R., PREECE, M. A. and IVANYI, J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of growth hormone activity in vivo. ***J Endocrinol***, v. 107 (3), p. R9-12, 1985.
- JENSEN, U. B., JENSEN, T. G., JENSEN, P. K., RYGAARD, J., HANSEN, B. S., FOGH, J., KOLVRAA, S. and BOLUND, L. Gene transfer into cultured human epidermis and its transplantation onto immunodeficient mice: an experimental model for somatic gene therapy. ***J Invest Dermatol***, v. 103 (3), p. 391-4, 1994.
- JENSEN, U. B., PETERSEN, M. S., LUND, T. B., JENSEN, T. G. and BOLUND, L. Transgene expression in human epidermal keratinocytes: cell cycle arrest of productively transfected cells. ***Exp Dermatol***, v. 9 (4), p. 298-310, 2000.
- JOHN M. COFFIN, S. H. H., HAROLD E. VARMUS. Retroviruses at the national center of biotechnology information - Principles of Retroviral Vector Design. v., 1997.
- JONES, P. H., HARPER, S. and WATT, F. M. Stem cell patterning and fate in human epidermis. ***Cell***, v. 80 (1), p. 83-93, 1995.
- KATZ, A. B. and TAICHMAN, L. B. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. ***J Invest Dermatol***, v. 112 (5), p. 818-21, 1999.

- KAY, M. A., LIU, D. and HOOGERBRUGGE, P. M. Gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94 (24), p. 12744-6, 1997.
- KOHN, D. B., HERSHFELD, M. S., CARBONARO, D., SHIGEOKA, A., BROOKS, J., SMOGORZEWSKA, E. M., BARSKY, L. W., CHAN, R., BUROTTO, F., ANNETT, G., NOLTA, J. A., CROOKS, G., KAPOOR, N., ELDER, M., WARA, D., BOWEN, T., MADSEN, E., SNYDER, F. F., BASTIAN, J., MUUL, L., BLAESE, R. M., WEINBERG, K. and PARKMAN, R. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. **Nat Med**, v. 4 (7), p. 775-80, 1998.
- KOLODKA, T. M., GARLICK, J. A. and TAICHMAN, L. B. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95 (8), p. 4356-61, 1998.
- KRUEGER, G. G., JORGENSEN, C. M., MATSUNAMI, N., MORGAN, J. R., LIIMATTA, A., MELONI-EHRIG, A., SHEPARD, R. and PETERSEN, M. J. Persistent transgene expression and normal differentiation of immortalized human keratinocytes in vivo. **J Invest Dermatol**, v. 112 (2), p. 233-9, 1999a.
- KRUEGER, G. G., JORGENSEN, C. M., PETERSEN, M. J., MANSBRIDGE, J. N. and MORGAN, J. R. Use of cloned genetically modified human fibroblasts to assess long-term survival in vivo. **Hum Gene Ther**, v. 8 (5), p. 523-32, 1997.
- KRUEGER, G. G., MORGAN, J. R. and PETERSEN, M. J. Biologic aspects of expression of stably integrated transgenes in cells of the skin in vitro and in vivo. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 111 (3), p. 198-205, 1999b.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227 (259), p. 680-5, 1970.
- LARCHER, F., DEL RIO, M., SERRANO, F., SEGOVIA, J. C., RAMIREZ, A., MEANA, A., PAGE, A., ABAD, J. L., GONZALEZ, M. A., BUEREN, J., BERNAD, A. and JORCANO, J. L. A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies:

- correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts. **Faseb J**, v. 15 (9), p. 1529-38, 2001.
- LAUFS, S., GENTNER, B., NAGY, K. Z., JAUCH, A., BENNER, A., NAUNDORF, S., KUEHLCKE, K., SCHIEDLMEIER, B., HO, A. D., ZELLER, W. J. and FRUEHAUF, S. Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. **Blood**, v. 101 (6), p. 2191-8, 2003.
- LI, A., SIMMONS, P. J. and KAUR, P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95 (7), p. 3902-7, 1998.
- LIN, S. C., LIN, C. R., GUKOVSKY, I., LUSIS, A. J., SAWCHENKO, P. E, ROSENFELD, M. G. Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. **Nature**, v. 364 (6434), p. 208-13, 1993.
- MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory - New York.
- MANN, R., MULLIGAN, R. C. and BALTIMORE, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell**, v. 33 (1), p. 153-9, 1983.
- MARKOWITZ, D., GOFF, S. and BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. **Virology**, v. 167 (2), p. 400-6, 1988a.
- MARKOWITZ, D., GOFF, S. and BANK, A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. **J Virol**, v. 62 (4), p. 1120-4, 1988b.
- MATHOR, M. (1994). **Estudos de expressão gênica mediante utilização de queratinócitos humanos normais transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica"**. (Tese de Doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN). São Paulo, SP, Brasil, Universidade de São Paulo.

- MATHOR, M. B., FERRARI, G., DELLAMBRA, E., CILLI, M., MAVILIO, F., CANCEDDA, R. and DE LUCA, M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93 (19), p. 10371-6, 1996.
- MC CORMACK, J. E., EDWARDS, W., SENSINTAFFER, J., LILLEGREN, L., KOZLOSKI, M., BRUMM, D., KARAVODIN, L., JOLLY, D. J. and GREENGARD, J. Factors affecting long-term expression of a secreted transgene product after intravenous administration of a retroviral vector. **Mol Ther**, v. 3 (4), p. 516-25, 2001.
- MENG, X., SAWAMURA, D., TAMAI, K., HANADA, K., ISHIDA, H. and HASHIMOTO, I. Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin 10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. **J Clin Invest**, v. 101 (6), p. 1462-7, 1998.
- MILLER, A. D. Progress toward human gene therapy. **Blood**, v. 76 (2), p. 271-8, 1990a.
- MILLER, A. D. and ROSMAN, G. J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. **Biotechniques**, v. 7 (9), p. 980-90, 1989.
- MILLER, D. G., ADAM, M. A. and MILLER, A. D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. **Mol Cell Biol**, v. 10 (8), p. 4239-42, 1990b.
- MORGAN, J. R., BARRANDON, Y., GREEN, H. and MULLIGAN, R. C. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. **Science**, v. 237 (4821), p. 1476-9, 1987.
- MORGAN, R. A. and ANDERSON, W. F. Human gene therapy. **Annu Rev Biochem**, v. 62 p. 191-217, 1993.
- ORKIN, A. G. M. S. H. Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. <http://www.nih.gov/news/panelrep.html>, v. p. 1-39, 1995.

- PAGE, S. M. and BROWNLEE, G. G. An ex vivo keratinocyte model for gene therapy of hemophilia B. ***J Invest Dermatol***, v. 109 (2), p. 139-45, 1997.
- PALMITER, R. D., BRINSTER, R. L., HAMMER, R. E., TRUMBAUER, M. E., ROSENFELD, M. G., BIRNBERG, N. C. and EVANS, R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. ***Nature***, v. 300 (5893), p. 611-5, 1982.
- PELLEGRINI, G., BONDANZA, S., GUERRA, L. and DE LUCA, M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. ***Med Biol Eng Comput***, v. 36 (6), p. 778-90, 1998.
- PFUTZNER, W., HENGGE, U. R., JOARI, M. A., FOSTER, R. A. and VOGEL, J. C. Selection of keratinocytes transduced with the multidrug resistance gene in an in vitro skin model presents a strategy for enhancing gene expression in vivo. ***Hum Gene Ther***, v. 10 (17), p. 2811-21, 1999.
- RHEINWALD, J. G. and GREEN, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. ***Cell***, v. 6 (3), p. 317-30, 1975.
- RIBELA, M. T., MURATA, Y., MORGANTI, L., TONIOLO, D. and BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. ***J Immunol Methods***, v. 159 (1-2), p. 269-74, 1993.
- ROBBINS, P. D., TAHARA, H. and GHIVIZZANI, S. C. Viral vectors for gene therapy. ***Trends Biotechnol***, v. 16 (1), p. 35-40, 1998.
- ROMAGNOLI, G., DE LUCA, M., FARANDA, F., BANDELLONI, R., FRANZI, A. T., CATALIOTTI, F. and CANCEDDA, R. Treatment of posterior hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium. ***N Engl J Med***, v. 323 (8), p. 527-30, 1990.

- ROSENBERG, S. A., AEBERSOLD, P., CORNETTA, K., KASID, A., MORGAN, R. A., MOEN, R., KARSON, E. M., LOTZE, M. T., YANG, J. C., TOPALIAN, S. L. and ET AL. Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **N Engl J Med**, v. 323 (9), p. 570-8, 1990.
- SALVATORI, G., FERRARI, G., MEZZOGIORNO, A., SERVIDEI, S., COLETTA, M., TONALI, P., GIAVAZZI, R., COSSU, G. and MAVILIO, F. Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers in vivo. **Hum Gene Ther**, v. 4 (6), p. 713-23, 1993.
- SPIRITO, F., MENEGUZZI, G., DANOS, O. and MEZZINA, M. Cutaneous gene transfer and therapy: the present and the future. **J Gene Med**, v. 3 (1), p. 21-31, 2001.
- STONE, D., DAVID, A., BOLOGNANI, F., LOWENSTEIN, P. R. and CASTRO, M. G. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. **J Endocrinol**, v. 164 (2), p. 103-18, 2000.
- TAI, I. T. and SUN, A. M. Microencapsulation of recombinant cells: a new delivery system for gene therapy. **Faseb J**, v. 7 (11), p. 1061-9, 1993.
- TAICHMAN, L. B. Systemic replacement therapy from genetically modified epidermal keratinocytes. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 111 (3), p. 206-10, 1999.
- TANI, H., MORRIS, R. J. and KAUR, P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97 (20), p. 10960-5, 2000.
- TEUMER, J., LINDAHL, A. and GREEN, H. Human growth hormone in the blood of athymic mice grafted with cultures of hormone-secreting human keratinocytes. **Faseb J**, v. 4 (14), p. 3245-50, 1990.
- THOMAS, K. R. and CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51 (3), p. 503-12, 1987.

- VERMA, I. M. and SOMIA, N. Gene therapy - promises, problems and prospects. **Nature**, v. 389 (6648), p. 239-42, 1997.
- VOGT, P. M., THOMPSON, S., ANDREE, C., LIU, P., BREUING, K., HATZIS, D., BROWN, H., MULLIGAN, R. C. and ERIKSSON, E. Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91 (20), p. 9307-11, 1994.
- WANG, X., ZINKEL, S., POLONSKY, K. and FUCHS, E. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94 (1), p. 219-26, 1997.
- WATT, F. M. Epidermal stem cells as targets for gene transfer. **Hum Gene Ther**, v. 11 (16), p. 2261-6, 2000.
- WHITE, S. J., PAGE, S. M., MARGARITIS, P. and BROWNLEE, G. G. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. **Hum Gene Ther**, v. 9 (8), p. 1187-95, 1998.
- WRAIGHT, C. J., WHITE, P. J., MCKEAN, S. C., FOGARTY, R. D., VENABLES, D. J., LIEPE, I. J., EDMONDSON, S. R. and WERTHER, G. A. Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides. **Nat Biotechnol**, v. 18 (5), p. 521-6, 2000.
- ZALLEN, D. Gene therapy crisis in the US. **Genetics & Society**, v. 16 (gene therapy), p. 272-274, 2000.
- ZELENOCK, J. A., WELLING, T. H., SARKAR, R., GORDON, D. G. and MESSINA, L. M. Improved retroviral transduction efficiency of vascular cells in vitro and in vivo during clinically relevant incubation periods using centrifugation to increase viral titers. **J Vasc Surg**, v. 26 (1), p. 119-27, 1997.