

## Enriquecimento de queratinócitos secretores de mGH em células-tronco mediante adesão rápida ao colágeno

Oliveira, NAJ; Cecchi, CR.; Higuti, E; Bartolini, P; Peroni, CN

Departamento de Biotecnologia, IPEN-CNEN, São Paulo, SP, Brasil  
cnperoni@ipen.br

**Palavras-chave:** colágeno IV, hormônio de crescimento de camundongo, queratinócitos, terapia gênica, camundongos lit/scid

**Introdução:** A obtenção de níveis persistentes de secreção de hormônio de crescimento (GH) *in vivo* é um dos principais desafios para que a terapia gênica baseada em queratinócitos modificados geneticamente possa ser empregada em seres humanos. A rápida queda dos níveis circulatórios de GH produzido por queratinócitos humanos primários transduzidos pode ser atribuída ao: baixo número de células-tronco transduzidas, inativação de componentes do vetor utilizado ou transporte ineficiente da proteína produzida para a circulação. **Objetivos:** Investigar se o enriquecimento da população de queratinócitos em células-tronco é um pré-requisito importante para a manutenção da expressão da proteína transgênica *in vivo*. **Métodos:** Uma das metodologias utilizadas para enriquecer uma determinada população de queratinócitos em células menos diferenciadas é a rápida adesão destas células progenitoras a substratos derivados de diferentes tipos de colágeno, utilizando-se a técnica da rápida adesão destas células a substratos derivados de colágeno IV. Os queratinócitos humanos foram cultivados e transduzidos com o gene do hormônio de crescimento de camundongo (mGH), seguindo protocolo padrão estabelecido em nosso laboratório. As células transduzidas foram semeadas em placas de cultura celular, previamente recobertas com colágeno humano tipo IV, e aquelas que não se aderiram em 5 e 15 minutos foram removidas e contadas, sendo assim determinada a porcentagem de células aderidas. Posteriormente foi avaliada a viabilidade celular e a produção de mGH *in vitro* e *in vivo*, mediante a construção de culturas organotípicas e implante desses enxertos em camundongos anões imunodeficientes (lit/scid). **Resultados:** As células tratadas com o colágeno por 5 min. apresentaram uma produtividade média de  $3,1 \pm 0,8 \mu\text{g mGH}/10^6 \text{cél.}/\text{dia}$ , enquanto as não tratadas de  $3,2 \pm 1,2 \mu\text{g mGH}/10^6 \text{cél.}/\text{dia}$ . Em termos de aumento da produção de mGH não foi portanto obtida uma diferença significativa entre as células tratadas e as não tratadas, resultado similar foi obtido com o tratamento por 15 min. Quanto à viabilidade celular, foi verificado que as células tratadas puderam ser cultivadas por um número maior de passagens do que as não tratadas: as células não tratadas entraram em senescência na 12ª passagem, enquanto as células tratadas por 5 min com colágeno estão atualmente na 18ª passagem. As culturas organotípicas derivadas dos queratinócitos transduzidos e enriquecidos pelo método de aderência ao colágeno apresentaram um valor médio de produção de mGH, após 1 hora do implante, de  $14,0 \text{ ng/ml} \pm 6,8 (n=3)$ ; enquanto os não enriquecidos apresentaram um valor médio de  $13,0 \text{ ng/ml} \pm 2,0 (n=3)$ . **Conclusões:** Os queratinócitos enriquecidos pelo método de aderência ao colágeno mostraram maior viabilidade celular *in vitro* do que os não enriquecidos. Mais estudos são necessários para determinar se o aumento de viabilidade que ocorre *in vitro* também ocorre *in vivo*, e se este fato implica numa maior durabilidade da secreção do mGH. **Apoio financeiro:** FAPESP e CNPq