

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ESTUDOS DA EXPRESSÃO GÊNICA MEDIANTE UTILIZAÇÃO
DE QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS
TRANSDUZIDOS COM O GENE DO HORMÔNIO
DE CRESCIMENTO HUMANO.
“POSSÍVEL UTILIZAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA”**

MONICA BEATRIZ MATHOR

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.**

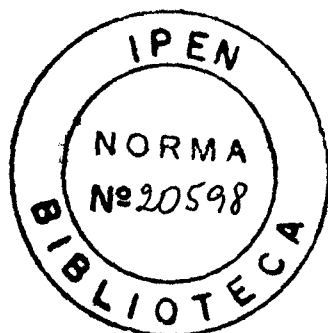
**Orientador:
Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo
1994**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

*ESTUDOS DA EXPRESSÃO GÊNICA MEDIANTE
UTILIZAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS
NORMAIS TRANSDUZIDOS COM O GENE DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO.
"POSSÍVEL UTILIZAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA"*

MONICA BEATRIZ MATHOR



Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientador: Dr. PAOLO BARTOLINI

**São Paulo
1994**

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação;

Ao Dr. Michele De Luca pela inestimável colaboração;

Aos colegas da Supervisão de Radioensaios e da Supervisão de Radiobiologia pela participação e apoio na realização deste trabalho;

À Dra. Giovanna Zambruno pelo apoio e colaboração;

Ao Dr. Ranieri Cancedda, Dr. Fulvio Mazúlio, Dr. Claudio Bordignon e à Dra. Mari Sogayar Armelin, pela colaboração, auxílio e por terem me cedido as dependências e recursos dos respectivos laboratórios;

Ao Dr. José Roberto Rogero pelo apoio;

Aos responsáveis e funcionários da Central de Radioimunoensaio de São Paulo (CRIESP) pela colaboração;

À Dra. Irene Schwarz e ao Dr. José Carlos Barbério pelo auxílio na correção deste trabalho;

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho;

A todos os amigos e familiares pelo apoio e paciência;

e principalmente ao FRAN.

**ESTUDOS DA EXPRESSÃO GÊNICA MEDIANTE UTILIZAÇÃO DE
QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS TRANSDUZIDOS COM O GENE DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO.
“POSSÍVEL UTILIZAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA”**

Monica Beatriz Mathor

RESUMO

Aproveitando-se dos recentes avanços nas técnicas de DNA-recombinantes e do potencial dos queratinócitos humanos normais em serem cultivados e reconstituir a epiderme para posterior implante, decidiu-se transformar geneticamente estes queratinócitos para que produzissem o hormônio de crescimento humano de maneira regulável, para possível utilização em terapia gênica. Para que isto fosse possível padronizou-se, preliminarmente, a técnica de infecção dos queratinócitos com células produtoras de retrovírus contendo uma construção retroviral com o gene da enzima bacteriana β -galactosidase. Os melhores níveis de infecção foram obtidos cultivando os queratinócitos por 3 dias em uma mistura de células produtoras e fibroblastos 3T3-J2, irradiados com 60 Gy, na proporção de 2:1, respectivamente, e repicando-se estes queratinócitos assim infectados em outra camada de sustentação constituída somente de fibroblastos 3T3-J2.

Outro experimento preliminar foi a infecção de queratinócitos humanos normais com o retrovírus portador do gene da Interleucina-6 que, em condições patológicas, pode ser produzida por queratinócitos e secretada para a circulação. Verificamos assim que os queratinócitos infectados e transformados expressam esta citocina por toda sua vida celular em cultura com uma produção de 500 ng/10⁶ cél./dia em média, comprovando o caráter permanente da transdução. Estes queratinócitos, quando enxertados em camundongos, secretam hIL-6 na circulação, atingindo níveis de 40 pg/ml de soro.

Após estes experimentos preliminares, passamos ao objetivo final construindo um vetor retroviral que contém o gene do hormônio de crescimento humano (hGH) sob controle do promotor da metalotioneína humana (hPMT) denominando-o **DChPMTGH**.

Os queratinócitos humanos normais foram infectados com as células produtoras do transgene DChPMTGH, utilizando o protocolo anteriormente padronizado, com a obtenção de queratinócitos infectados que produzem e liberam para o meio de cultura 340 ng de hGH/10⁶ cél./dia sem a ativação do promotor, constitui a maior secreção de hGH em cultura primária de queratinócitos humanos transfectados já descrita na literatura. Os valores de hGH obtidos com a introdução da construção DChPMTGH em queratinócitos aumenta de, aproximadamente, 10 vezes quando estes são ativados com zinco 100 μ M por 8 a 12 horas.

GENE EXPRESSION STUDIES IN HUMAN KERATINOCYTES TRANSDUCED WITH HUMAN GROWTH HORMONE GENE FOR A POSSIBLE UTILIZATION IN GENE THERAPY

Monica Beatriz Mathor

ABSTRACT

Taking advantage of the recent progress in the DNA-recombinant techniques and of the potentiality of normal human keratinocytes primary culture to reconstitute the epidermis, it was decided to genetically transform these keratinocytes to produce human growth hormone under controllable conditions that would be used in gene therapy at this hormone deficient patients.

The first step to achieve this goal was to standardize infection of keratinocytes with retrovirus producer cells containing a construct which included the gene of bacterial β -galactosidase. The best result was obtained cultivating the keratinocytes for 3 days in a 2:1 mixture of retrovirus producer cells and 3T3-J2 fibroblasts irradiated with 60 Gy, and splitting these infected keratinocytes on 3T3-J2 fibroblasts feeder layer.

Another preliminary experiment was to infect normal human keratinocytes with Interleukin-6 gene (hIL-6) that, in pathologic conditions, could be produced by keratinocytes and secreted to the blood stream. Thus, we verify that infected keratinocytes secrete an average amount of 500 ng/10⁶ cell/day of cytokin during the *in vitro* life time, that certify the stable character of the infection. These keratinocytes, when grafted in mice, secrete hIL-6 to the blood stream reaching levels of 40 pg/ml of serum.

After these preliminary experiments, we construct a retroviral vector with the human growth hormone gene (hGH) driven by human metallothionein promoter (hPMT), designated DChPMTGH. Normal human keratinocytes were infected with DChPMTGH producer cells, following previously standardized protocol, obtaining infected keratinocytes secreting to the culture media 340 ng hGH/10⁶ cell/day without promoter activation. This is the highest level of hGH secreted in human keratinocytes primary culture described in literature. The hGH value increases approximately 10 times after activation with 100 μ M Zn⁺² for 8-12 hours.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	9
CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
1. Terapia Gênica	10
2. Hormônio de Crescimento	10
2.1. Estrutura Gênica	10
2.2. Fatores de regulação	11
2.2.1. Sequências em "cis"	11
2.2.2. Fatores em "trans"	12
2.2.3. Outros fatores reguladores	13
3. Tipos de Vetores	15
3.1. Retrovírus	15
3.2. Vetores recombinantes retrovirais defectivos	16
3.3. Elementos virais de regulação	17
4. Tipos Celulares e Órgãos Alvo	19
4.1. Células Hematopoiéticas	19
4.2. Células Hepáticas	19
4.3. Células Musculares	20
4.4. Células Endoteliais	20
4.5. Células Epiteliais	21
4.5.1. Fibroblastos	21
4.5.2. Queratinócitos	21
4.6. Células Somatotróficas	22
5. Metalotioneína	24
5.1. O gene e sua proteína	24
5.2. O promotor	24
6. Zinco	26
7. Antibióticos para Seleção	26
7.1. Higromicina B	27
7.2. Geneticina	27
8. Interleucina-6	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. Tipos de Células Eucarióticas	30
1.1. Queratinócitos	30
1.2. Fibroblastos	30
1.2.1. Como camada de sustentação	30
1.2.2. Como células de empacotamento viral	31
2. Cultura de Células	32
2.1. Queratinócitos	32
2.2. Fibroblastos 3T3-J2 e NIH-3T3 resistentes ou não	33
2.3. Fibroblastos GP+E86, GP+envAm12 e seus derivados	33
3. Coloração Celular	34
3.1. Ensaio com corante vital	34
3.2. Ensaio com corante não vital	34

4. Testes de eficiência de cultura	35
4.1. Eficiência de formação de colônias (EFC)	35
4.2. Crescimento da população celular (CC)	35
5. Determinação do tempo de vida celular	36
6. Análise do RNA (Northern blotting)	37
6.1. Extração e purificação do RNA total dos queratinócitos	37
6.2. Eletroforese e transferência	37
6.3. Hibridização	38
6.4. Normalização dos resultados	38
7. Plasmídeos Utilizados	39
7.1. pRSV5neo	39
7.2. pMCg/9	39
7.3. phMT-IIA	39
7.4. phIL-6	39
7.5. phGH6A	39
8. Amplificação dos plamídeos	40
8.1. Eletroporação em bactérias	40
8.2. Amplificação	40
9. Purificação dos plamídeos	41
9.1. Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico	41
9.2. QIAGEN	41
9.3. Gradiente de CsCl	41
9.4. Membrana DEAE celulose (NA-45)	42
10. Vetores Retrovirais Utilizados	43
10.1. LXS	43
10.2. N2A	44
11. Construção Retroviral	46
12. Seqüenciamento	46
13. Transfecção em Células de Mamíferos	47
13.1. Eletroporação	47
13.2. Lipofectina	47
13.3. Polibreno	47
13.4. Cloreto de Cálcio	48
14. Preparo de Células Produtoras	49
14.1. Transfecção e Infecção retroviral	49
14.2. Titulação	49
15. Determinação da Atividade do Gene Transfectado ou Infectado	50
15.1. Ensaio de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)	50
15.2. Enzimaimunoensaio (ELISA)	51
15.3. Radioimunoensaio (RIE)	51
15.4. Fluoroimunoensaio (DELFA)	52
15.5. Teste Histoquímico para β -Galactosidase	53
15.5.1. Em células	53
15.5.2. Em cortes histológicos	53
15.6. Western Blotting	54
15.6.1. SDS-PAGE	54
15.6.2. Transferência	54
15.6.3. Imunorreação	55
15.6.4. Autorradiografia	55
16. Enxerto de Células Epidérmicas em Cultura	56

7. Preparo de vetor retroviral contendo o cDNA de uma proteína circulante (Interleucina-6), sem um promotor regulável -----	96
7.1. Vetor retroviral LhIL6SN-----	96
8. Obtenção das células produtoras do gene da Interleucina-6 -----	98
8.1. Transfecção transiente em células ecotróficas-----	98
8.2. Infecção permanente em células anfotróficas-----	98
8.3. Determinação quantitativa de IL- 6-----	100
8.4. Titulação-----	100
9. Infecção dos Queratinócitos com a Construção Viral Am12/LhIL6SN -----	101
9.1. Infecção-----	101
9.2. Comparação entre tempos de vida celular de queratinócitos infectados com diferentes vetores-----	101
9.3. Confirmação da infecção permanente-----	104
9.4. Determinação "in vivo"-----	105
10. Preparo da construção retroviral do cDNA do hormônio de crescimento humano, sob controle do promotor regulável da metalotioneína -----	107
10.1. Construção retroviral DChPMTGH-----	107
10.2. Seqüenciamento-----	110
11. Transfecção dos Queratinócitos com a Construção Retroviral DChPMTGH -----	111
11.1. Transfecção-----	111
11.2. Ativação-----	111
12. Obtenção das células Produtoras do Vetor Retroviral Contendo o Gene do Hormônio de Crescimento Humano Ligado ao Promotor de Metalotioneína -----	113
12.1. Transfecção transiente em células ecotróficas-----	113
12.2. Infecção permanente em células anfotróficas-----	113
12.3. Determinação quantitativa-----	114
12.4. Titulação-----	114
13. Infecção dos Queratinócitos com a Construção Viral Am12/DChPMTGH -----	115
13.1. Infecção-----	115
13.2. Determinação qualitativa-----	115
13.3. Determinação quantitativa-----	117
13.4. Ativação-----	117
13.4.1. Ativação durante 10 horas-----	117
13.4.2. Comparação entre ativação diária durante 10 horas e ativação permanente---	118
DISCUSSÃO -----	120
CONCLUSÕES -----	139
REFERÊNCIAS -----	141

1. Estudo do comportamento dos queratinócitos, quando expostos a metais como Zinco e Cádmio-----	61
1.1. Verificação por coloração da toxidez do Zinco e Cádmio em queratinócitos em crescimento exponencial, variando as concentrações destes metais -----	61
1.2. Verificação por coloração da toxidez do Zinco e Cádmio em queratinócitos confluentes, variando as concentrações destes metais -----	62
1.3. Verificação da toxidez do Zinco em queratinócitos, em crescimento exponencial, variando o tempo de exposição a estes metais -----	63
1.4. Verificação visual da toxidez do Zinco em queratinócitos, em crescimento exponencial, variando as concentrações deste metal -----	64
2. Verificação da variação da quantidade de mRNA da metalotioneína nos queratinócitos quando ativados com metais, para constatação do funcionamento do mecanismo de ação do promotor de metalotioneína-----	66
2.1. Variação de concentração de Zinco -----	66
2.2. Variação do tempo de ativação -----	68
2.3. Comparação entre queratinócitos primários de diferentes indivíduos -----	70
3. Preparo de uma linhagem de fibroblastos resistentes ao antibiótico que será utilizado para selecionar os queratinócitos transfectados. Verificação da eficiência destes fibroblastos quando utilizados como "feeder layer" -----	73
3.1. Concentração ideal do antibiótico-----	73
3.2. Fibroblastos resistentes à geneticina-----	74
3.2.1. Eficiência de Formação de Colônias (EFC) -----	76
3.2.2. Crescimento de população celular (CC)-----	77
4. Transfecção e co-transfecção dos plasmídeos que contém os cDNAs do gene da resistência à neomicina (pRSV5neo), da metalotioneína (pHMTIIA), do gene CAT (pMCg/9) e do hormônio de crescimento humano (pGH6A) -----	78
4.1. Transfecções Permanentes -----	78
4.2. Transfecção transiente-----	79
5. Padronização do método de infecção retroviral dos queratinócitos, utilizando o gene da β-Galactosidase como marcador -----	81
5.1. Vetor retroviral LBSN -----	81
5.2. Células produtoras do gene β -gal (Am12/LBSN) -----	81
5.3. Teste de verificação de eficiência das células produtoras Am12/LBSN, quando utilizadas como "feeder layer" -----	82
5.3.1. Crescimento de população celular-----	82
5.3.1.1. Variação de concentração celular e intensidade de irradiação-----	82
5.3.1.2. Variação de concentração com mistura de linhagens celulares -----	84
5.3.2. Eficiência de formação de colônias -----	85
5.4. Infecção dos queratinócitos com as células Am12/LBSN, utilizando tempo e concentrações variadas de polibreno -----	86
5.5. Determinação do tempo de infecção e quantidades de queratinócitos inicialmente semeados -----	87
5.5.1. Contato das células até a semi-confluência dos queratinócitos-----	87
5.5.2. Duplo contato com as células infectivas -----	88
5.5.3. Variação da concentração de queratinócitos e de tempo de contato -----	88
5.6. Clonagem das células infectadas para confirmação de expressão -----	91
6. Caracterização "in vivo" do produto da infecção com Am12/LBSN -----	94
6.1. Infecção dos queratinócitos-----	94
6.2. Preparo do enxerto -----	94
6.3. Implante da epiderme reconstituída "in vitro"-----	94
6.4. Verificação da manutenção do gene infectado -----	95

INTRODUÇÃO

Segundo Cournoyer e colaboradores (30), a forma de terapia "definitiva", seria a habilidade de introduzir informação genética para corrigir diretamente ou substituir a função de genes afetados. Esta afirmativa corrobora os pensamentos da maioria dos profissionais preocupados com a saúde humana.

A evolução desta idéia está sendo possível, graças ao esforço conjunto de clínicos e pesquisadores que, com seu trabalho, vem permitindo a caracterização de anomalias moleculares de genes responsáveis por doenças humanas.

Bartolini e colaboradores, no IPEN, vem desenvolvendo estudos para a produção e caracterização do Hormônio de Crescimento Humano (hGH) para tratamento de nanismo hipofisário (7) e, mais recentemente, a preparação de Hormônio de Crescimento e outros hormônios biossintéticos mediante técnica de DNA-recombinante (9).

Seguindo a linha de pensamento acima citada e direcionando-a para os trabalhos já realizados pelo nosso grupo, pudemos verificar que são inúmeras as possibilidades de utilização das técnicas de DNA-recombinante no tratamento de doenças endócrinas. Como exemplo, teríamos, no futuro, tratamentos convencionais administrando hormônios protéicos (obtidos biossinteticamente), sendo substituídos, parcialmente, por Terapias Gênicas alternativas. Relacionada com esta idéia, temos a primeira "cura" gênica em mamíferos efetuada por Hamer e colaboradores na linhagem "little" de

camundongos, transfectando células-ovo destes com o gene do hormônio de crescimento ligado a metalotioneína (68).

Ainda no mesmo campo, podemos verificar igual ponto de vista, analisando os trabalhos produzidos por Seldem e col. (136), com sua técnica denominada "implantação transcariótica"; por Morgam e colaboradores (102) e por Teumer e colaboradores (144), demonstrando que é possível o enxerto, em camundongos atímicos, de epiderme formada de queratinócitos transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano e demonstrando posteriormente que, com a escolha justa da construção retroviral (101), é possível um alto rendimento de infecção. Estes queratinócitos são ainda capazes, quando transplantados, de diferenciar-se formando uma pele estratificada. Brem e colaboradores (21) estudaram as conseqüências da expressão do hormônio de crescimento humano em camundongos transgênicos, além de outros aspectos, já inseridos nos livros texto mais modernos de Endocrinologia, tais como as técnicas de transferência gênica, a regulação da expressão gênica e, principalmente, as potenciais aplicações da tecnologia de DNA-recombinante. Entre estas lembramos a transferência de genes em indivíduos que sofrem de defeitos na expressão de genes específicos, como por exemplo a obtenção de biópsias de pele ou fígado e sua utilização para preparo de cultura de células nas quais podem ser inseridos genes apropriados, com posterior transplante nos próprios pacientes (67).

Com os recentes avanços das técnicas de DNA-recombinante, foram intensificados os esforços para desenvolver uma terapia alternativa para várias doenças que, sabidamente, tem como causa principal defeitos em genes específicos (30). Esta nova abordagem terapêutica é chamada **Terapia Gênica**, e

poderá, no futuro, ser utilizada, não só visando diretamente a informação gênica defeituosa, mas também para introduzir drogas terapêuticas em órgãos alvo do paciente.

A terapia gênica vem sendo tratada com extremo cuidado devido à preocupação de vários setores da sociedade, com os reais benefícios para o paciente e com as possibilidades futuras de utilização de técnicas envolvendo DNA-recombinante em seres humanos. Entretanto, podemos verificar que as barreiras e desconfianças de ordem moral estão caindo à medida que os estudos científicos (sempre controlados por comissões mistas competentes) vão sendo aprofundados.

Nos Estados Unidos da América os protocolos de terapia gênica são controlados pelo "Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)", pelo "RAC's Human Gene Therapy Subcommittee" e pelo próprio diretor do "National Institutes of Health (NIH)", sendo também fiscalizados pela "Food and Drug Administration (FDA)" (33), órgão responsável pelo desenvolvimento de uma estrutura de trabalho e padrões técnicos dos produtos utilizados em células somáticas e terapia gênica, complementando as funções do RAC (79).

Estes controles levam em conta, principalmente, evidências de que o procedimento irá beneficiar o paciente e que os riscos de prejuízos serão muito baixos (30), sempre seguindo o princípio de que só podem ser utilizadas células somáticas afetando somente o paciente tratado, evitando possíveis problemas às próximas gerações (149).

Relacionamos a seguir, como exemplo, as dificuldades encontradas por F. Anderson, S. Rosenberg & M. Blaese, a fim de que os primeiros testes em humanos pudessem ser efetuados.

O primeiro protocolo envolvia transferência gênica em pacientes cancerosos terminais. Consistia na reintrodução de Linfócitos Tumor Infiltráveis (TILs), estimulados com Interleucina-2 e marcados com um gene resistente à neomicina (34, 38). Estes linfócitos podem também ser um excelente veículo para a introdução de outros genes capazes de produzir substâncias de combate ao câncer, tais como TNF, Interferon- γ (128), Interleucina-4 (143), etc.. Para que se pudessem efetuar testes que comprovassem que fatores como o de crescimento, dependência da Interleucina-2, fenótipo e expressão normal de outros genes, não eram significativamente alterados (75), assim como para a verificação do período de sobrevivência destas células "in vivo" (2), foram realizadas pesquisas "in vitro", utilizando o mesmo tipo de linfócitos humanos, estimulados em cultura.

Este protocolo que levou vários meses até ser finalmente aprovado em janeiro de 1989 e realizado em maio de 1989 (24,, 35), foi apenas o primeiro passo, pois ainda não levaria a um benefício terapêutico para o paciente.

Passos subseqüentes foram os pedidos para autorização de terapia gênica em pacientes cancerosos, utilizando o gene do Fator de Necrose Tumoral Humana (TNF) e a transferência do gene da enzima Adenosina Deaminase (ADA) em crianças com Imunodeficiência Combinada Severa (SCID), nas quais este gene não é funcional (36, 61).

Inicialmente foram obtidos resultados animadores em seis pacientes com melanoma, tratados com o gene transfectado. Após seis meses as células infectadas ainda podiam ser detectadas no sangue de vários destes pacientes e o acúmulo de TIL em depósitos tumorais foi detectado até 2 meses após a infusão dos linfócitos (127, 128). Após um ano não houve nenhuma evidência de toxidez (37), nem de anticorpos contra a proteína do envelope viral (128).

Os protocolos foram aprovados e as autorizações concedidas em agosto de 1990, após várias revisões e discussões, consumindo mais de um ano de estudos (33, 32, 37, 39, 36, 62, 64, 63), sendo a terapia realizada em setembro do mesmo ano (40).

Em maio de 1992 havia 11 protocolos ativados, 9 aprovados (em fase de iniciação) em 3 diferentes continentes e uma dezena de protocolos diversos em vários estágios de desenvolvimento (3).

Até meados de 1993 a FDA já tinha revisado quase 50 propostas para terapia gênica das quais, aproximadamente, 80% envolviam tratamento “ex vivo” das células somáticas com vetores contendo transgenes, seguido da administração das células modificadas ao paciente e, pelo menos, 20% envolviam a administração direta do vetor (79).

Na Europa, o primeiro protocolo para Terapia Gênica foi aprovado na Itália, sendo realizado, com pleno êxito (comunicação pessoal), em meados de 1992 por Bordignon e colaboradores (grupo com o qual colaboramos no presente trabalho), utilizando o mesmo gene (ADA) que foi utilizado nos Estados

Unidos (50, 19). Este pedido pôde ser efetivado após exaustivos estudos "in vitro" e "in vivo", por exemplo, com camundongos imunodeficientes injetados com linfócitos humanos transfectados com vetor retroviral contendo um mini-gene ADA humano (54, 18).

As principais exigências impostas, no momento, à utilização da terapia gênica são a necessidade de que outras terapias, já consagradas, tenham falhado e a constatação da inexistência de uma terapia alternativa (31).

Atualmente os pré-requisitos rotineiramente considerados para as doenças que interessam à terapia gênica são:

- a patogenicidade da doença deve ser entendida a nível molecular e envolver um único gene;
- a seqüência do DNA correspondente deve ser conhecida;
- devem ser estabelecidos métodos efetivos de distribuição do gene;
- devem ser conhecidas seqüências e ou proteínas regulatórias, permitindo uma expressão apropriada do gene transferido;
- e, finalmente, levando em conta as dificuldades na execução e o custo potencial desta terapia, parece ser razoável, no momento, limitar esta aplicação a doenças severas, desprovidas de terapia alternativa adequada (29).

Apesar das restrições para sua utilização verificamos uma tendência muito forte para que esta técnica venha a ser adotada, cada vez mais, em futuro próximo. Segundo palavras do Dr. Michael Blaese, no próximo século a terapia gênica se transformará numa das principais modalidades de tratamento (16).

Uma alternativa para a substituição do gene defeituoso é a terapia de adição gênica. Nesta técnica, células que normalmente não expressam um gene específico podem ser transformadas, passando a expressá-lo (98).

Paralelamente aos estudos de Anderson, Rosenberg & Blaese, outras linhagens celulares vem sendo pesquisadas, já que vários tipos de tecidos podem ser alvos apropriados para a correção de defeitos genéticos (82). Esta técnica vem abrangendo cada vez mais outros horizontes, como a terapia para vários tipos de câncer com mais de vinte estudos pré-clínicos e aproximadamente 10 protocolos terapêuticos aprovados no "RAC" do NIH (158); a terapia para várias doenças neurológicas, tais como Alzheimer, Parkinson, Gaucher, síndrome de Sly e síndrome de Lesch-Nyhan (142) e a terapia para doenças cardíacas como a provocada pela hipercolesterolemia familiar (103). O gene de resistência a multi-drogas pode ser usado para aumentar os níveis de tolerância a drogas quimioterápicas (145). Outros estudos prevêem a terapia de doenças pulmonares como a deficiência de α 1-antitripsina (α 1AT) (129) e fibrose cística (73, 130), a terapia para doenças hepáticas como a deficiência de produção do fator IX causando a Hemofilia B (77), a terapia para infecções por HIV, tanto envolvendo a expressão deste como alterando seus receptores (145) e o tratamento de doenças metabólicas como o diabetes mellitus (110).

Segundo Anderson, genes produtores de hormônios que circulam no sangue não são os candidatos mais apropriados para terapia gênica, pois o controle natural de retro-regulação da expressão do hormônio pelo DNA não é ainda conhecido, dificultando assim a produção dos níveis fisiológicos corretos (4). A nosso ver, com o avanço dos conhecimentos, estes também podem vir a ser utilizados.

Justamente este tipo de visão serviu de incentivo para o nosso trabalho, pois poderíamos contribuir com a padronização de uma metodologia que pudesse ser útil no futuro.

Muito ainda deve ser pesquisado, antes que a terapia gênica possa ser incorporada, definitivamente, às alternativas de tratamento médico no campo endocrinológico. Pelos argumentos aqui expostos, porém, podemos visualizar um amplo campo de estudo e pesquisa que serviria como base para uma futura terapia gênica que possa incluir plenamente também a Endocrinologia.

OBJETIVOS

O nosso objetivo principal foi fazer com que células eucarióticas que, normalmente, não expressam o hormônio de crescimento humano em quantidades mensuráveis, passem a fazê-lo de maneira controlada.

Para chegar ao nosso objetivo principal, era necessário alcançar alguns objetivos intermediários, tais como:

- Determinar se a maneira pretendida de regulação da produção hormonal seria ativa nas nossas células alvo;
- Conseguir altos rendimentos de introdução do transgene (vetor que carrega o gene desejado) nas células alvo e para tanto padronizar um protocolo com um marcador de fácil visualização;
- Testar este protocolo com um transgene que codificasse para uma proteína que fosse liberada em circulação e que, sabidamente, pudesse ser expressa pelas células alvo;
- Determinar o caráter permanente “in vitro” e “in vivo” da introdução do transgene;
- Preparar a construção do cDNA do hormônio de crescimento sob o controle de um promotor regulável;
- Introduzir esta construção nas células alvo, ensaiar não só a expressão do hormônio de crescimento humano por estas células, bem como a regulação desta expressão.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. *Terapia Gênica*

Entende-se como terapia gênica, a transferência de material genético para as células de um organismo tornando-as aptas para tratamento de uma doença. Podemos verificar que a terapia gênica é comparável ao transplante de órgão ou tecido para tratamento de uma doença, uma vez que o transplante do tecido, de um doador normal, também resulta na transferência de genes normais para o paciente (98).

2. *Hormônio de Crescimento*

Para melhor desenvolvimento do nosso trabalho prático, devemos levar em conta alguns aspectos básicos inerentes ao gene de hormônio de crescimento, sua regulação e expressão:

- *A relação entre função e estrutura da família de genes de hGH, vem sendo exaustivamente estudada ao longo do tempo (137, 27).*
- *Sendo sua transcrição tecido-específica, faz-se necessário o estudo de todos os fatores de regulação, tanto do próprio promotor, como das seqüências que agem em "cis" e fatores que agem em "trans" (12, 17, 49, 56, 82, 83, 85, 109, 108, 111, 147, 148).*

2.1. *Estrutura Gênica*

Sabe-se que a família do gene do hormônio de crescimento é constituída de cinco membros com alta homologia, estando codificados dentro de 66,5 kb na banda q22-q24 do cromossomo 17 (27). As categorias foram

baseadas na semelhança com o hormônio de crescimento humano (hGH), ou com a somatotrofina coriônica (CS): o hGH-N (também conhecido por GHA) que é o próprio hGH pituitário, sendo expresso nos somatotrofos da glândula pituitária anterior; o hGH-V (também conhecido por GHB) que codifica para um polipeptídeo GH-"like" e difere do hGH em 13 posições, com evidências da existência do seu mRNA na placenta; o hCSA e o hCSB que são genes que expressam formas de CS no sincício placentário e, por último, o hCS-L (também conhecido por CSHP-1) que é um pseudo-gene (137, 27). Todos estes genes já foram seqüenciados representando, aproximadamente, 0,1% do cromossomo 17 humano (27).

2.2. Fatores de regulação

2.2.1. Seqüências em "cis"

Algumas seqüências que agem em "cis" já são conhecidas, como um fragmento genômico descoberto por Nelson e col. (109), sendo uma região "enhancer" (intensificadora) que se encontra na posição -235 a -47 pares de bases (pb) da região de iniciação de transcrição e que continua intensificando a expressão do hormônio de crescimento, independentemente de sua posição ou orientação no gene. Já Tripputi e col. (148) localizaram uma seqüência na região 5' do gene do rGH (-320 a -237) que reprime a expressão do hormônio, porém não age quando localizada em outra posição. Esta região "silenciadora" age reprimindo a atividade do promotor de rGH em células não pituitárias, não tendo efeito nas células pituitárias (147). Segundo Norman e cols (111), o gene do hormônio de crescimento parece ter quatro elementos (-180, -160, -60 e -20) que

respondem ao hormônio da tireóide (T_3) e não somente dois (-190 e -140) como anteriormente descrito.

2.2.2. Fatores em “trans”

Também já são conhecidos alguns fatores que agem em "trans", como o "fator do hormônio de crescimento-1" (GHF-1) encontrado por Lefevre e col. (82) e que pode ser detectado somente em células que expressam hormônio de crescimento. Tal fator reconhece dois sítios (-65 a -97 e -107 a -132) da região 5', antes do início da transcrição do hGH, funcionando como um promotor pituitário-específico sendo que a seqüência na região mais próxima, ou seja nos primeiros 94 nucleotídeos, demonstrou ser suficiente para conferir a expressão ao gene hCS-A em células GC (uma linhagem de tumor pituitário de rato) (107). O mesmo grupo demonstrou que a adição de frações contendo GHF-1 a extratos de células HeLa, as quais tem uma expressão de GH muito baixa, faz com que seja estimulado o promotor de hGH (17). Nelson e col. (108) descreveram outro fator "ativador de transcrição pituitária-1 (Pit-1)", que ativa também o gene de prolactina e, provavelmente, o de TSH, porém posteriormente Lemaigre e col. (83) publicaram que GHF-1 e Pit-1 parecem ser a mesma proteína. A descoberta destes fatores auxiliou estudos posteriores onde foi confirmado que a região de regulação transcripcional do gene do hormônio de crescimento é altamente conservada na evolução dos vertebrados (5). Sittler e col. (138) descreveram mais duas regiões relacionadas ao elemento do promotor que possui propriedades tecido-específicas (GHF2 e GHF3), as quais ligam fatores que não tem propriedades tecido-específicas, agem em "trans" mas parecem ter seus efeitos mediados por Pit-1.

2.2.3. Outros fatores reguladores

Além desses fatores temos a ação de outros, como o ácido retinóico que é um metabólito ativo da vitamina A e parece agir a nível da transcrição do GH, interagindo com um complexo de receptores hormônio-responsivos (12), a Somatostatina (SRIF) que tem influência inibitória, o GHRH (GH - releasing hormone), o hormônio tiroideano (T_3) e os glucocorticóides capazes de estimular a transcrição e produção do hormônio de crescimento (49, 56).

Com estes dados da literatura, podemos concluir que a regulação deste hormônio em células não específicas não é uma tarefa simples, dependendo de vários fatores interrelacionados.

Para evitar a dependência sítio-específica da expressão do gene, uma alternativa a ser estudada seria a formação de híbridos de células pituitárias e não pituitárias, para a expressão do gene de GH nestas últimas. Temos que levar em conta porém, a força do fenômeno de extinção, onde elementos que atuam como fatores inibidores nas células não pituitárias, podem passar a atuar também nas células pituitárias (147).

Outra alternativa seria a adição de um promotor que não fosse inativado nas nossas células em estudo (85). Para tentar resolver o problema da quantidade de hormônio expressa, poderíamos utilizar um promotor regulável.

De posse destes conhecimentos temos as ferramentas necessárias para conseguir que o gene de hGH, após transfectado, possa expressar a proteína desejada.

Outros estudos que devem ser efetuados são: qual o tipo celular, qual o tecido e qual o melhor vetor (vírus, retrovírus, adenovírus, plasmídeo ou cosmídeo, etc.) a serem utilizados, pois a regulação da expressão da proteína vai depender também destes fatores (81, 108, 146, 147, 148).

3. Tipos de Vetores

O número dos vetores disponíveis, que teoricamente, podem ser utilizados, é muito vasto, dependendo do objetivo final. Temos como exemplos vetores derivados de Herpes Vírus (Herpes Vírus defectivo), que possuem um tropismo natural para as células do sistema nervoso (58), de adenovírus que podem ser utilizados em células diferenciadas, incapazes de proliferação, tais como, células neuro-musculares ou células que não podem expandir, como as células epiteliais pulmonares (141).

Embora todos os tipos de vetores virais de DNA estejam sendo estudados, a maioria dos pesquisadores, no campo da terapia gênica, utiliza vetores derivados de retrovírus, pois estes podem receber material genético maior que os derivados de vírus, converter o seu RNA em DNA na célula infectada e dirigir este DNA para dentro do cromossomo, além de poder receber, indiferentemente, RNA ou DNA. Outra vantagem é o amplo espectro de espécies animais e tipos celulares que eles podem infectar (149).

3.1. Retrovírus

O ciclo de vida de um retrovírus envolve (Fig. 1):

- a) ligação do vírion (proteínas de revestimento da partícula viral) (84) na superfície da célula receptora;
- b) transferência do RNA genômico para dentro da célula onde ele é copiado para DNA por uma enzima viral especializada (**transcriptase reversa**);
- c) integração desta cópia do DNA no cromossomo hospedeiro e
- d) utilização do maquinário da célula para produção do vírion.

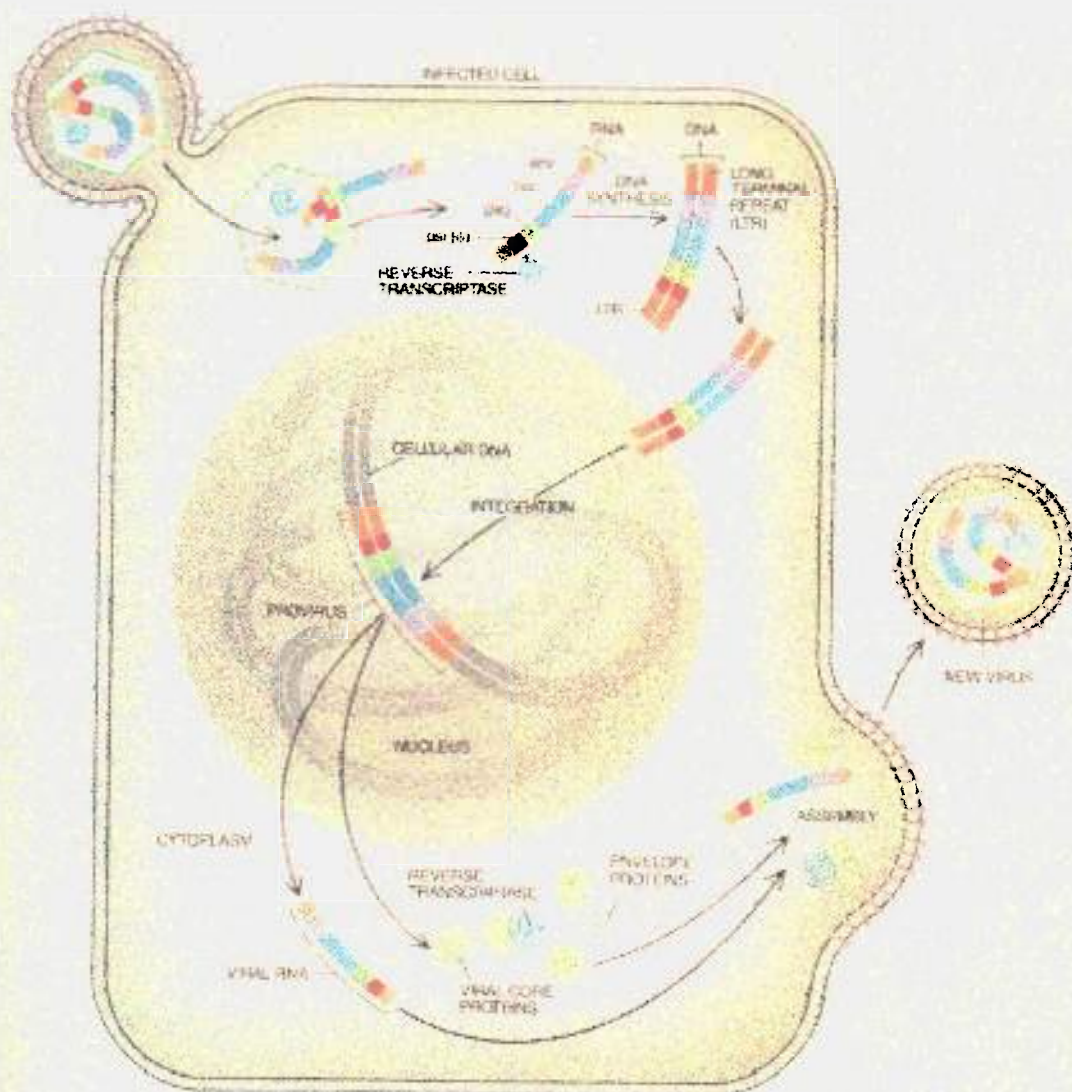


Fig.1. Replicação do retrovírus na célula infectada (149).

3.2. Vetores recombinantes retrovirais defectivos

Vetores recombinantes defectivos são produzidos com a substituição dos genes estruturais do retrovírus **gag** (gene que codifica as proteínas que compõem o corpo viral), **pol** (gene que codifica a transcriptase reversa) e **env** (gene que codifica as proteínas do envelope), pela informação a ser transferida. Estes vetores mantêm a região Ψ que é necessária para o encapsidamento do material genético. Este processo envolve células chamadas "linhagem celular de empacotamento de retrovírus" (packaging cells). Nestas

células são produzidas as proteínas virais necessárias para a formação do vírion, por meio do "helper-virus" que fornece as funções ausentes no vetor recombinante defectivo (84), permitindo que se complete o ciclo viral, com o encapsidiamento do vetor, transmitindo as informações codificadas pelos RNAs do próprio vírus (alteração Ψ). Desta forma há transferência do DNA de interesse para o genoma celular sem haver proliferação viral (Fig. 2) (98, 22).

3.3. Elementos virais de regulação

Os elementos virais de regulação ("enhancer" e promotor), conduzem a uma expressão eficiente dos genes transduzidos, na maioria das linhagens celulares, embora possam ser incluídas seqüências de regulação adicionais para maior expressão ou maior especificidade, como por exemplo, para conseguir um vetor que possa distribuir um gene diretamente em um neurônio em cultura, sem alterar suas propriedades eletrofisiológicas ou, no cérebro de mamíferos adultos, (59) para terapia de tumores cerebrais ou mal de Parkinson.

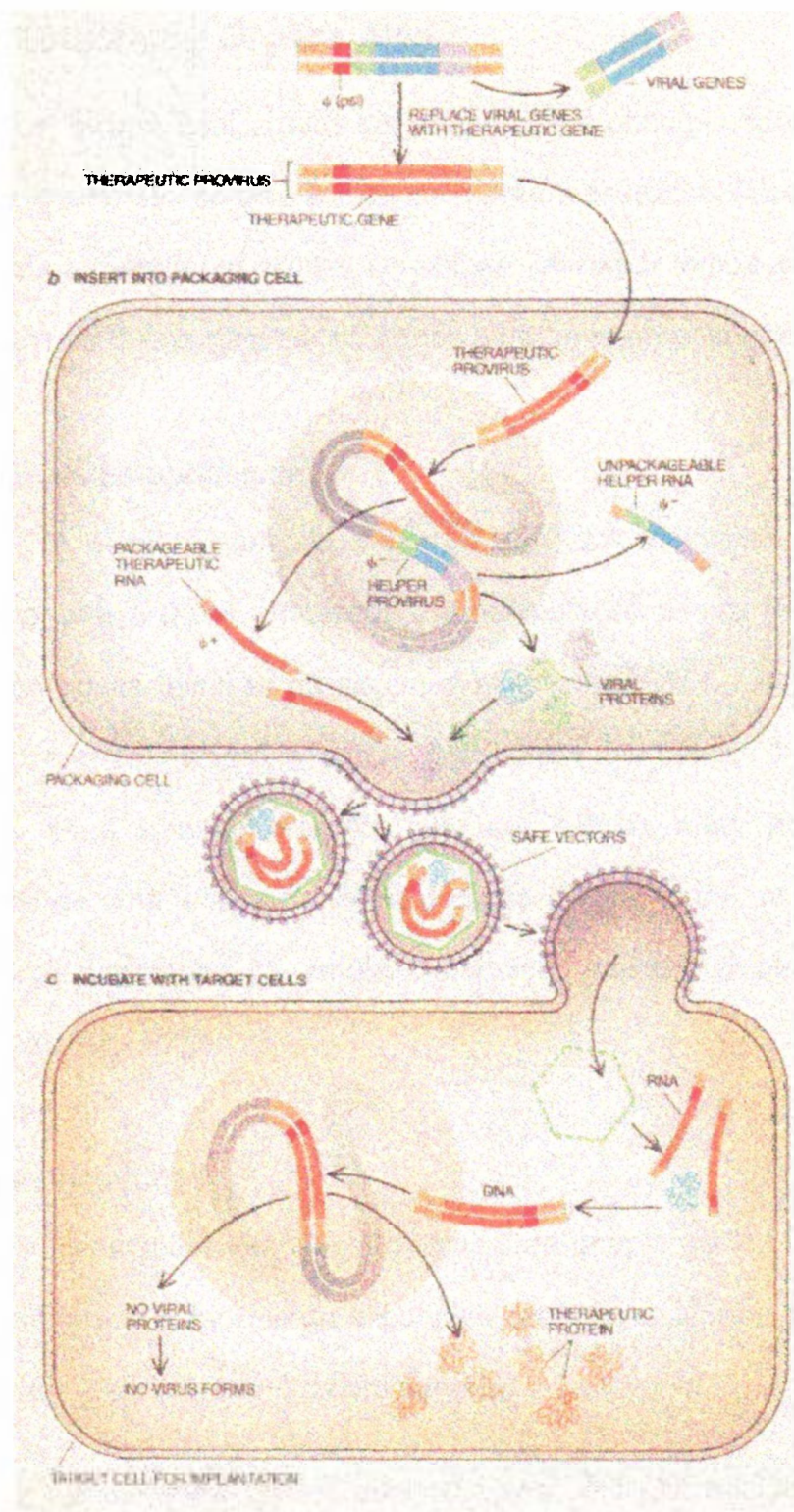


Fig.2. Esquema de infecção retroviral intermediada por células de empacotamento de retrovírus (149). (A) Construção do pró-vírus contendo o transgene (gene de interesse). (B) Inserção da construção nas células de empacotamento de retrovírus. (C) Infecção das células alvo.

4. Tipos Celulares e Órgãos Alvo

A terapia gênica pode ser efetuada, em princípio, tanto em linhagem germinativa, quanto em células somáticas, porém por razões éticas e práticas só é considerada a terapia em células somáticas. A seguir temos alguns exemplos de tipos celulares que podem ser utilizados para transferência gênica.

4.1. Células Hematopoiéticas

O sistema hematopoiético é um dos principais alvos para a transferência gênica pelos processos de manipulação clínica já desenvolvidos, não existindo novas técnicas ou sistemas alternativos (15), levando-se também em conta o grande número e ampla distribuição de células hematopoiéticas, sendo que, se a transferência for feita em células mãe, aumentaremos a possibilidade de uma terapia de longa duração (98). Porém, no caso do estudo com proteínas hormonais, a ampla distribuição dessas células dificultaria o controle da expressão gênica.

4.2. Células Hepáticas

Hepatócitos também são alvos para terapia gênica (6), porém a sua cultura primária não é facilmente expansível, pois suas células podem dividir-se poucas vezes. Sendo assim é de fundamental importância:

- a) que a transferência gênica seja efetuada com alta eficiência, obtendo-se um número suficiente de células para o transplante;
- b) decidir onde estas células serão transplantadas, ou seja, na cavidade intraperitoneal, intradérmica, etc.(76).

4.3. Células Musculares

Recentes experiências demonstraram que é possível transferir genes diretamente para músculos de camundongos "in vivo", por injeção direta do DNA no músculo esquelético (153); este DNA, aparentemente, permanece em estado extracromossomal não integrado.

4.4. Células Endoteliais

Células endoteliais vasculares são alvos interessantes pelo seu acesso direto à circulação, servindo como veículo para distribuição de drogas terapêuticas, tendo sido demonstrado recentemente por Zwiebel e col. (156), que células endoteliais humanas (células endoteliais de veia umbilical) são capazes de expressar um gene recombinante após transdução por vetor retroviral. O mesmo grupo já havia demonstrado anteriormente que células endoteliais de coelho podem secretar hormônio de crescimento de rato a níveis de $1\mu\text{g}/10^6$ células/dia (157).

Outro dado importante foi apresentado por Nabel e colaboradores (105) demonstrando que um gene recombinante pode ser expresso na rede vascular por meio de células endoteliais geneticamente modificadas implantadas em sítios específicos na parede arterial. Os autores demonstraram também, em um trabalho posterior, que um gene recombinante pode ser eficientemente expresso em um sítio específico "in vivo" pela introdução direta do material genético por cateterismo (106).

4.5. Células Epiteliais

4.5.1. Fibroblastos

São potenciais alvos para terapia gênica porque podem ser facilmente expandidos e crescem facilmente em cultura, sendo que já há vários anos foi verificado que resistem a transplantes em sistemas utilizando ratos como modelo (13). Terapia gênica mediada por fibroblastos pode ser um sistema promissor de distribuição gênica, pois estes podem ser caracterizados antes do implante, vários locais podem ser de escolha para transplante e estas células implantadas podem ser manipuladas, se necessário (112). Porém vários autores mencionam o fato dos fibroblastos não produzirem progressos clínicos ou bioquímicos prolongados, além de sofrerem várias mudanças em cultura que podem afetar sua habilidade em manter o enxerto após o transplante (98).

4.5.2. Queratinócitos

A epiderme humana é um epitélio estratificado organizado em compartimentos proliferativos e pós-mitóticos. Queratinócitos pertencentes ou muito próximos à membrana basal constituem a principal população de células proliferativas (células basais e células mãe), enquanto células localizadas nas camadas médias superiores da epiderme cessaram a sua replicação e estão no processo de estratificação e diferenciação terminal (células diferenciadas) (120).

Os queratinócitos humanos normais podem ser seqüencialmente cultivados. Sob condições de cultura apropriada, estes reconstituem “in vitro” uma lâmina de epitélio transplantável, mantendo virtualmente as mesmas características de diferenciação e o mesmo padrão de expressão gênica de seus

correspondentes “in vivo” (47), representando um sistema ideal de investigação da fisiologia epidérmica.

Os queratinócitos são capazes de secretar proteínas biologicamente ativas após transferência gênica. O hGH, por exemplo, pode ser obtido em cultura de queratinócitos humanos infectados com vetor derivado de retrovírus contendo o gene de hormônio de crescimento humano (102). Podemos também obter uma eficiente transferência gênica em queratinócitos co-cultivados com fibroblastos que produzem vírus modificados (98).

4.6. Células Somatotróficas

O hormônio de crescimento é produzido, especificamente, em células somatotróficas do lobo anterior da glândula pituitária, órgão de difícil acesso, e nenhum outro tecido produz quantidades significativas desse hormônio. Por esse motivo, seria interessante estudar a possibilidade de modificação de outras linhagens celulares de mais fácil acesso.

Dentre as linhagens celulares conhecidas, elegemos os queratinócitos como nosso primeiro alvo de estudo, já que estes sintetizam e respondem a uma larga gama de fatores reguladores de crescimento, positiva ou negativamente (46, 47 , 151).

Estes queratinócitos modificados poderiam expressar o hormônio de crescimento e este seria distribuído pela circulação, à semelhança da apolipoproteína E que, segundo Fenjves e col. (53), atravessa a barreira

epiderme-derme e alcança a circulação, proporcionando uma distribuição sistêmica e podendo agir em tecidos distantes.

Queratinócitos podem ser obtidos facilmente e crescer em cultura, formando uma camada que pode ser transplantada e facilmente controlada. Estes transplantes vêm sendo largamente utilizados no lugar da pele danificada de pacientes queimados (42), pacientes com defeitos na mucosa oral (43), reconstrução de partes de órgãos com defeitos congênitos (126), etc..

As pesquisas até agora efetuadas com a transfecção do gene do hormônio de crescimento, tanto em queratinócitos (102), como em fibroblastos (136), chegaram à detecção de níveis razoáveis de hormônio de crescimento "in vitro" enquanto na corrente sangüínea dos animais que receberam estas células transformadas isto foi possível somente no caso dos fibroblastos e por um curto período de tempo.

5. Metalotioneína

5.1. O gene e sua proteína

As metalotioneínas são proteínas pequenas ricas em cisteínas que têm a habilidade de coordenar íons de zinco, cádmio e cobre. Acredita-se que a função principal da metalotioneína é a manutenção da homeostase do “pool” de zinco dentro do organismo.

O gene da metalotioneína (MT) pode ser expresso na maioria dos tecidos, fato concordante com o seu papel de gene residente em vários tipos celulares, apesar dos níveis particularmente altos dessa proteína no fígado e rins.

Nos mamíferos, as MTs existem como um grupo de isoformas que diferem muito pouco na seqüência de aminoácidos e no total de cargas. As duas principais formas que foram isoladas são as MT-I e MT-II, que diferem pelo volume de eluição na cromatografia de troca iônica (78).

A sua expressão pode ser induzida por certos fatores relacionados com a indução de tensão (“stress”) ou por concentrações elevadas de metais pesados, sendo que o aumento dos níveis de metalotioneína podem prover certa proteção contra efeitos tóxicos destes metais pesados (134).

5.2. O promotor

As regiões regulatórias 5' da família de genes da metalotioneína, têm sido largamente utilizadas como promotores induzíveis. Os melhores indutores desses promotores são os íons de metais pesados, particularmente, o Cd^{++} e o Zn^{++} . Sua indução é mediada por fatores ativados por metais (MAFs) que reconhecem elementos responsivos a metais (MREs) localizados dentro dos

promotores de MT. Estes promotores também contêm elementos que são reconhecidos por fatores de transcrição constitutivos e geram um nível basal significativo da expressão gênica (55).

Os promotores de MT também podem ser induzidos por outros agentes, tais como glicocorticóides, progesterona, interleucina-6 e interferon. Estas proteínas se ligam ao receptor de glicocorticóides, o qual se torna ativo e estimula a transcrição por interação direta com elementos responsivos a glicocorticóides (GREs) localizados nas regiões regulatórias do gene (55).

A região regulatória 5' do gene MT-IIA humano contém um promotor muito forte já amplamente caracterizado. Além de quatro MREs e pelo menos quatro elementos constitutivos (dois AP2, um AP1 e um SP1), o promotor MT-IIA também contém um GRE. O grau de indução com glicocorticóides varia com o tipo de célula porém, em geral, é menor que com íons de metais pesados (55).

6. Zinco

O zinco é um elemento essencial, que deve ser mantido em traços no organismo, com atividade estrutural e funções catalíticas em uma variedade de enzimas. O zinco é essencial para a atividade de ligação de fatores transcricionais ao DNA, estabilizando sua estrutura secundária (134).

A quantidade de Zinco que deve ser ingerida diariamente pelo homem (dieta recomendada pela Food and Nutrition Board of National Academy of Sciences, USA) é de 3 mg para crianças a 15 mg para adultos (92).

Os compostos terapêuticos à base de Zinco são empregados, por exemplo, na forma de sulfato de zinco a 4%, em certas doenças de pele e infecções como acne, lupus eritematoso e impetigo, ou na forma de cloreto de zinco em soluções de 0,2 a 2% como adstringente (70).

7. Antibióticos para Seleção

Geneticina e Higromicina B são membros de uma classe de aminoglicosídeos altamente tóxicos a todos os tipos de células eucarióticas estudadas. Os antibióticos aminoglicosídeos são antagonistas da síntese proteica normal, tendo potencial influência na frequência de troca de cromátides irmãs (SCE). Alguns genes, já clonados, das fosfotransferases (por exemplo, **neo** e **hph**) proporcionam resistência a esses aminoglicosídeos, sendo a base para sistemas de seleção dominante largamente utilizados em biologia molecular. Este sistema tem sido utilizado, entre outros, no auxílio à geração de animais transgênicos, como identificação da transferência de cromossomos humanos normais em células humanas mutantes e seleção de células a serem introduzidas

em pacientes cancerosos, como início dos experimentos para a terapia gênica (95).

7.1. Higromicina B

A Higromicina B é uma 2-deoxiestreptamina monossubstituída contendo um aminoglicosídeo que interfere diretamente com o fator de alongação EF-2, perturbando o estágio de alongação que envolve peptídeos previamente iniciados nos polissomos.

7.2. Geneticina

A Geneticina é uma molécula bissubstituída (2-DOS), interferindo em estágios relacionados com a iniciação da síntese protéica.

Os aminoglicosídeos são também moléculas policatiônicas com forte afinidade para fosfolipídeos e mucopolissacarídeos, DNA e nucleotídeos (95).

8. Interleucina-6

As interleucinas foram consideradas, inicialmente, como fatores solúveis de derivação leucocitária, ativos sobre os próprios leucócitos. Hoje, tanto a função das interleucinas, como seus alvos, abrangem novas áreas. Atualmente são descritas 13 interleucinas diferentes, das quais a IL-1, IL-6 e a IL-8, juntamente com o interferon $TNF-\alpha$, são os principais mediadores da inflamação sendo chamados **citoquinas inflamatórias**. As citoquinas inflamatórias são produzidas pela maioria dos tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos exógenos e endógenos, sendo também capazes de regular as funções de um número variado de tipos celulares (155).

A interleucina-6 é uma glicoproteína produzida por uma variedade de tipos celulares, porém os macrófagos e os fibroblastos são considerados as maiores fontes desta citoquina. A IL-6 não é expressa "in vivo" pelas células de maneira constitutiva, mas somente após estímulos adequados. Os fatores capazes de induzir a produção de IL-6 são, principalmente, as duas citoquinas pré-inflamatórias IL-1 e $TNF-\alpha$, mas também outras citoquinas, assim como a própria IL-6, produtos virais e bacterianos e os esteroides de forbol. A IL-6 está envolvida na resposta inflamatória e imune, estimula a produção hepática de proteínas da fase inflamatória aguda, é um dos pirogênicos endógenos, induz à proliferação e diferenciação de células estaminais hematopoiéticas, etc. (26).

Elevados níveis séricos de IL-6 têm sido descritos em pacientes gravemente queimados, com septicemia e após administração de endotoxinas a indivíduos voluntários sadios, como comprovação da relação desta citoquina com os processos inflamatórios e infectivos. A IL-6 também demonstrou ter efeitos

antitumorais “in vivo”, sendo um gene candidato para a imunoterapia do câncer (26).

Na epiderme, tanto os queratinócitos como as células de Langerhans e os melanócitos são capazes de produzir IL-6 em resposta a estímulos adequados (155). Não é evidenciável “in vivo” nenhuma síntese de IL-6 na epiderme humana normal, enquanto que em condições patológicas, em particular na psoríase, foi demonstrada uma expressão significativa não só na derme como também na epiderme. Os queratinócitos humanos normais “in vitro” produzem IL-6, porém em quantidades muito baixas (117).

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descreveremos os métodos utilizados, assim como os principais reagentes e equipamentos.

1. Tipos de Células Eucarióticas

1.1. Queratinócitos

Os queratinócitos utilizados foram obtidos a partir de culturas primárias de biópsias de pele de doadores voluntários adultos saudáveis, prepúcio de neonatos e indivíduos com queimaduras generalizadas.

1.2. Fibroblastos

1.2.1. Como camada de sustentação

Os fibroblastos de camundongo utilizados como camada de sustentação foram as linhas celulares 3T3-J2 (gentilmente fornecidas pelo Dr. Michele De Luca do IST, Gênova, Itália) e NIH-3T3 (gentilmente fornecidos pelo Dr. Roberto Biassoni do IST, Gênova, Itália) respectivamente sem e com resistência a geneticina (G-418).

1.2.2. Como células de empacotamento viral

GP+E-86 (93) e GP+envAm12 (94), linhagens celulares de empacotamento viral ("packaging line") (Fig. 3), obtidas pelo Dr. Arthur Bank (Columbia University, USA) a partir de células NIH-3T3 transfectadas, cedidas pela Genetix Pharmaceuticals, USA.

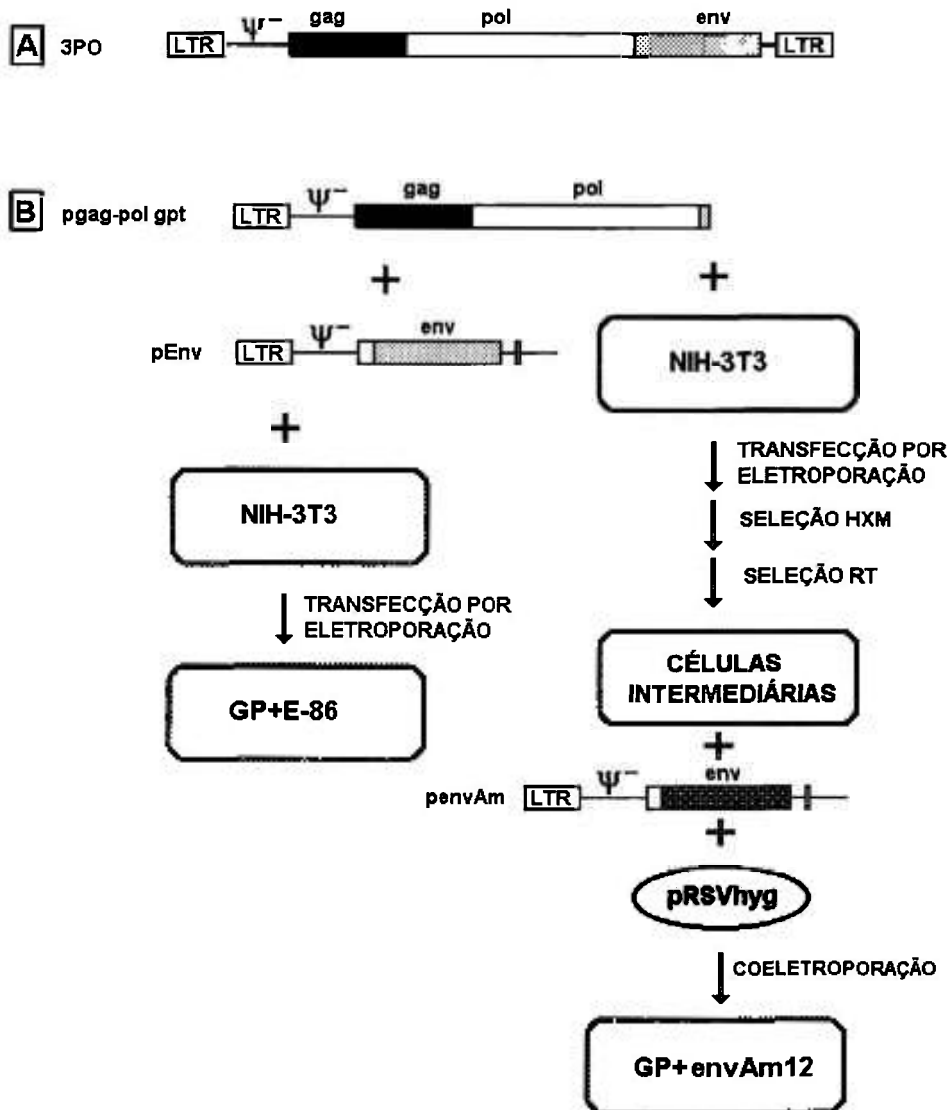


Fig. 3. Esquema de obtenção das células de empacotamento viral GP+E86 e GP+envAm12. (A) Estrutura do "helper virus" 3PO completo. (B) Obtenção de células de empacotamento viral ecotróficas a partir dos plasmídeos pgag-pol gpt e pEnv e células anfotróficas a partir dos plasmídeos pgag-pol gpt e penvAm.

A partir destas células foram obtidas as células produtoras de β -Galactosidase (Am12/LBSN) gentilmente fornecidas pelo Dr. Fulvio Mavilio (DIBIT Milão, Itália), Interleucina-6 humana (Am12/LhIL6SN) e Hormônio de crescimento humano (Am12/DChPmetGH).

2. Cultura de Células

2.1. Queratinócitos

Queratinócitos de epiderme humana foram cultivados a partir de biópsias de pele de aproximadamente 2 cm². Estas biópsias foram cortadas em pequenos pedaços, e tripsinizadas (tripsina 0,05%/EDTA 0,01%) sob agitação branda a 37°C por 3 horas, retirando as células tripsinizadas a cada meia hora. As células separadas em suspensão, foram semeadas (2x10⁶ células/garrafa de 75 cm²) em uma camada de sustentação ("feeder layer") de fibroblastos 3T3-J2, irradiados a 60 Gy (6000 rads) e cultivados em KGM (Keratinocyte Growth Medium) a 37°C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂. O KGM é constituído de Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) e Ham's F12 (na proporção de 2:1), contendo 10% de soro fetal bovino, glutamina (4 mM), penicilina-estreptomicina (50 U.I./ml), adenina (0,18 mM), insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), hidrocortisona (0,4 µg/ml), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/ml, "epidermal growth factor", Chiron Corp. Emeryville, CA, USA) (44, 66, 122). Este é o meio de cultura rotineiramente utilizado na reconstituição "in vitro" de epiderme e mucosa para o reparo de defeitos destas (41). Culturas primárias subconfluentes foram tripsinizadas e passadas em densidades variadas segundo as necessidades.

Esta propagação pode ser efetuada por diversas vezes consecutivas, sendo denominadas de passagens ou repiques (45). Os queratinócitos transfectados e infectados foram cultivados da mesma maneira.

2.2. Fibroblastos 3T3-J2 e NIH-3T3 resistentes ou não

As células 3T3-J2 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), contendo 10% de soro bovino, penicilina-estreptomicina (50 U.I./ml) e glutamina (4 mM). As células NIH-3T3 foram cultivadas em "Dulbecco's modified Eagle's", contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina-estreptomicina (50 U.I./ml) e glutamina (4 mM). Ambas as linhas celulares foram cultivadas a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, até atingirem a confluência, antes de serem irradiadas para a utilização como camada de sustentação.

2.3. Fibroblastos GP+E86, GP+envAm12 e seus derivados

As células GP+ E-86 e GP+envAm12 foram cultivadas, por curtos períodos, em "Dulbecco's modified Eagle's", contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina-estreptomicina (50 U.I./ml) e glutamina (4 mM). No caso de manutenção destas células por tempo prolongado, foram adicionados ao meio de cultura os seguintes reagentes: hipoxantina (15 µg/ml), xantina (250 µg/ml), ácido micofenólico (25 µg/ml) e para as GP+envAm12, também higromicina (200 µg/ml). Estas culturas foram mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas, ou seja, a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂.

3. Coloração Celular

3.1. Ensaio com corante vital

O corante vital escolhido foi o Vermelho Neutro (hidroclorato de 3-amino-m-dimetilamino-2-metil-fenazina). Após a cultura das células, em placas contendo seis poços de $9,6 \text{ cm}^2$, o meio de cultura foi retirado e adicionado 1 ml de Vermelho Neutro na concentração de $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$, obtida diluindo (a 0,4%) uma solução estoque com meio de cultura DMEM. Após 3 horas de incubação a 37°C , a cultura celular foi lavada rapidamente com 1 ml de uma solução constituída de 4% de formaldeído e 1% de CaCl_2 . Foram então adicionados 0,5 ml de solução de extração (1% de ácido acético +50% de etanol) e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a última incubação, foi lida a absorbância da solução em um comprimento de onda de 540 nm (20).

3.2. Ensaio com corante não vital

As culturas foram incubadas por 5 min com 1 ml de Rodamina B ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{C}_1\text{N}_2\text{O}_3$), que é incorporada tanto nas células vivas, quanto nas mortas. Este corante é utilizado numa concentração de 2% em uma solução de 4% de formaldeído, sendo posteriormente lavadas em água corrente até a eliminação total do excesso de corante (123). A quantificação é efetuada mediante contagem visual.

4. Testes de eficiência de cultura

4.1. Eficiência de formação de colônias (EFC)

A **EFC** é derivada de culturas obtidas a partir de 1000 queratinócitos semeados em placas de 9,6 cm², contendo uma camada uniforme de 3T3 irradiados ($2,3 \times 10^5$ células). Estas culturas foram mantidas, com troca de meio a cada 2 dias, por 10 a 12 dias (enquanto as colônias são ainda discretas), sendo então coradas com um corante não vital (Rodamina B) e contadas. Cada colônia corresponde a uma célula semeada que aderiu à placa, multiplicando-se posteriormente (123). A **EFC** é calculada pela razão entre o número de colônias obtidas e o número de células semeadas.

4.2. Crescimento da população celular (CC)

O **CC** foi determinado por meio da contagem do número de células, que sofreram um certo tratamento, com relação ao seu controle. Em cada experimento, foram semeados 5×10^4 queratinócitos em placas de 9,6 cm², contendo uma camada uniforme de 3T3 irradiados ($2,3 \times 10^5$ células). Para os experimentos de comparação de linhas celulares, utilizadas como camada de sustentação, os queratinócitos após atingirem a confluência das colônias na placa de controle, foram tripsinizados, ressuspensos em meio de cultura e contados em câmara hemocitométrica. No caso da observação do efeito de metais, a contagem foi efetuada após o final do experimento (11).

5. *Determinação do tempo de vida celular*

A determinação do tempo de vida de cultura celular foi feita semeando 5×10^4 queratinócitos em placas de $9,6 \text{ cm}^2$, contendo uma camada uniforme de 3T3 irradiados ($2,3 \times 10^5$ células); no momento em que as colônias atingiram a sub-confluência, as células foram tripsinizadas (0,05% de Tripsina e 0,01% de EDTA), contadas e passadas para novas placas de cultura na mesma densidade da primeira passagem, sendo semeadas 1000 células para a determinação da **EFC**. Este procedimento foi repetido até a impossibilidade destas células se manterem em cultura (121).

A determinação do número de gerações celulares foi calculada usando a seguinte formula (125):

$$x = 3.322 \log \frac{N}{N_0}$$

onde:

- x é o número gerações
- N é o número total de células obtidas após cada tripsinização
- N_0 é o número de células semeadas multiplicada pela EFC correspondente.

6. Análise do RNA (Northern blotting)

6.1. Extração e purificação do RNA total dos queratinócitos

O RNA dos queratinócitos foi extraído de células congeladas lisando-as com 4 ml de uma solução contendo tiocianato de guanidina (4,2 M), N-lauril sarcosine (0,5%), citrato de sódio (25 mM), pH 7,3. Após homogeneização em homogeneizador mecânico J4 a 35.000 rpm por 5 min a 4°C, o volume total foi adicionado a um tubo de polialômero contendo camadas de CsCl (2,0 ml de CsCl 5,7 M; 2,1 ml de CsCl 3,4 M; 2,1 ml de CsCl 1,4 M) e centrifugado a 37.000 rpm por 14 horas a 14°C em ultracentrífuga Beckman L5-50B classe H, com rotor SW41Ti. O precipitado de RNA, no fundo do tubo, foi dissolvido em 200 µl de Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, extraído com clorofórmio e reprecipitado duas vezes com etanol. O precipitado foi ressuspensão em H₂O e sua concentração determinada por meio da leitura da absorbância a 260 nm (28).

6.2. Eletroforese e transferência

Uma alíquota (10 µg/poço) do RNA obtido, foi fracionada por peso por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% em ácido 3-[N-Morfolino]propano sulfônico (MOPS) contendo 0,2 M de formaldeído (89) e transferido por capilaridade para uma membrana de nylon (GeneScreen Plus, Du Pont-New England Nuclear) em cloreto de sódio 1,5 M e citrato de sódio 0,15 M. O RNA transferido foi fixado covalentemente por exposição a 1200 µW/cm² de luz UV (47).

6.3. Hibridização

Para a determinação da presença dos mRNAs dos genes que codificam as proteínas metalotioneína e "heat shock" (HSP70), a membrana contendo o RNA dos queratinócitos, foi hibridizada com as sondas HMTIIa (135) e pH 2.3 (154), respectivamente (gentilmente fornecidas pelo Dr. Arturo Leone, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Médica da Faculdade de Medicina, Universidade de Nápoles, Itália). Estas foram marcadas com ^{32}P (2×10^6 cpm/ml). Para que ocorresse a hibridização, a membrana foi incubada, juntamente com as sondas marcadas, por 16 horas a 42°C em 50% de formamida deionizada, cloreto de sódio 0.75 M, fosfato de sódio 25 mM, EDTA 5 mM, 0.2 mg de DNA de salmão/ml, 0.5% de SDS e 10% de dextran sulfato, após uma pré-hibridização de 3 horas a 42°C com a mesma mistura isenta das sondas. Foram efetuadas quatro lavagens de 30 minutos a 65°C em cloreto de sódio 15 mM, fosfato de sódio 1 mM, EDTA 1 mM e 0.1% de SDS, sendo que a primeira lavagem continha 50% de formamida (48). Os filtros foram autorradiografados em filmes de raios-X (Hyperfilm-MP, Amersham), com película intensificadora, a -70°C. As sondas foram marcadas pelo método "random-priming" (52) e denaturadas com NaOH por 5 min. à temperatura ambiente, antes de serem adicionadas à mistura de hibridização (47).

6.4. Normalização dos resultados

A normalização das quantidades de RNA foi feita por meio de densitometria uni- ou bi-dimensional, relativamente à banda 18S ou 28S de cada RNA ribossomal correspondente, do negativo da foto do gel de agarose corado com brometo de etídio. O equipamento utilizado foi o LKB UltraScan XL.

7. Plasmídeos Utilizados

7.1. pRSV5neo

Contém o gene de resistência a neomicina sob o controle do promotor SV40 clonado no plasmídeo pBR322 (86).

7.2. pMCg/9

Contém o promotor do gene da metalotioneína de camundongo e o CAT como gene repórter (135).

7.3. pHMT-IIA

É constituído pelo cDNA da metalotioneína humana II, contendo um sítio Nco I logo após o promotor da metalotioneína; foi clonado no sítio Hind III do plasmídeo pUC-9 (97).

7.4. pHIL-6

É constituído pelo cDNA do IFN- β_2 (interleucina-6) clonado no sítio Pst I do plasmídeo pUC-9, contendo resistência a ampicilina.

7.5. pHGH6A

É constituído pelo cDNA do hGH, selecionado de uma biblioteca obtida pelo Dr. Paolo Bartolini, e clonado no sítio Eco RI do plasmídeo pUC-9, contendo resistência a ampicilina (10).

8. Amplificação dos plasmídeos

8.1. Eletroporação em bactérias

Foram adicionados 2 μ l de solução aquosa, contendo 10 ng de plasmídeo, a 100 μ l de bactérias competentes (descongeladas lentamente) e estas colocadas por 1 minuto em cubetas de eletroporação geladas, sendo então levadas ao eletroporador (BioRad Gene Pulser) aplicando as seguintes condições: 25 μ F, 200 ohms e 2,3 kV. Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados 900 μ l de meio LB pré aquecido a 37°C. Todo o conteúdo foi vertido em um tubo de ensaio e incubado por 1 hora a 37°C sob agitação máxima de 220 rpm. Foram aplicados 100 μ l desta suspensão e outros 100 μ l da suspensão, concentrada 10 vezes, em placas de LB-agar-ampicilina.

8.2. Amplificação

As colônias do hospedeiro DH-1 E.coli, resistentes a ampicilina, foram amplificadas, crescendo em meio LB (Bacto-Triptona, Bacto-Extrato de Levedura e NaCl) com ampicilina, até densidade de saturação.

9. Purificação dos plasmídeos

9.1. Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico

As bactérias foram lisadas e os DNAs foram extraídos com NaOH 0,2M, 1% de SDS e Acetato de potássio 3M pH 4,8 e purificados por extração com mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2). Após a purificação o DNA foi precipitado com etanol e ressuspenso com Tris 10 mM (87).

9.2. QIAGEN

Os plasmídeos das máxi-preparações foram obtidos pelo método da lise alcalina das bactérias e purificados em colunas de afinidade denominadas, comercialmente, QIAGEN (DIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha). O protocolo é baseado em trocas de tampões com alteração de pH, sendo que para a retenção do DNA na coluna foi utilizado um tampão pH 7,0 (NaCl 1,0 M, MOPS 50 mM e etanol 15%) e para a sua eluição foi utilizado um tampão pH 8,2 (NaCl 1,25 M, MOPS 50 mM e etanol 15%).

9.3. Gradiente de CsCl

A repurificação foi efetuada com duplo bandeamento de equilíbrio com CsCl-Brometo de etídio, por ultracentrifugação, com rotor vertical VTi-50, em ultracentrífuga Beckman, L5-50B, classe H (87).

9.4. Membrana DEAE celulose (NA-45)

As purificações dos fragmentos e dos vetores, após eletroforese em gel de agarose 1%, foram efetuadas com membrana DEAE celulose - Schleicher & Schuell NA-45 (152, 51), utilizando-se uma solução de baixa concentração salina (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 mM e Tris 20 mM pH 8,0) para lavar a membrana dos resíduos do gel e uma solução de alta concentração salina (NaCl 1,0 M, EDTA 0,1 mM e Tris 20 mM pH 8,0) para a extração do DNA da membrana.

10. Vetores Retrovirais Utilizados

Os vetores retrovirais foram escolhidos em razão de já terem sido aprovados para utilização em células humanas, obtendo-se altos títulos, altos níveis de expressão do gene de interesse e estabilidade de integração (131).

10.1. LXS_N

Contém duas seqüências "long terminal repeat" (LTR) do MoMLV (vírus da leucemia murina Moloney), sendo que a 5'-LTR controlará a transcrição do gene de interesse que será inserido neste vetor. Além deste promotor forte, contém também o gene neomicina fosfotransferase (que confere a resistência à neomicina), sob o controle do promotor Simian vírus (SV-40). O plasmídeo que contém é um fragmento do pBR322 contendo a resistência à ampicilina e o seu sítio de clonagem, para inserção do gene de interesse, é constituído dos seguintes sítios de restrição: Eco RI, Hpa I, Xho I e Bam HI (100). Este vetor não contém a seqüência viral *env* e na seqüência *gag* o ATG foi trocado por TGA (Fig. 4).

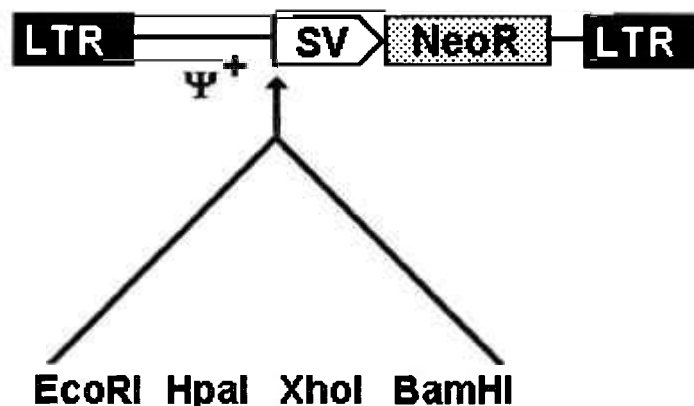


Fig. 4. Estrutura do vetor retroviral LXS_N

10.2. N2A

Este vetor retroviral consiste de duas LTRs e, entre elas, seqüências de origem viral codificando o sinal de empacotamento e outras essenciais para replicação, além de seqüências de origem não viral, tais como marcadores para seleção.

A LTR é, funcionalmente, subdividida em 3 regiões: U₃, R e U₅. Na região U₃ estão o sítio intensificador viral e as funções promotoras que são ativas na LTR-5', mas não na LTR-3'. O sítio inicial do RNA viral é indicado pelas bordas entre as regiões U₃ e R, na LTR-5', e o seu final é indicado pela borda entre as regiões R e U₅, na LTR-3' (69).

Como a região U₃ no LTR-3' é o molde para a síntese da região U₃ em ambas as LTRs (5' e 3') da progênese do pró-vírus, o gene transduzido será duplicado e também transferido para a LTR-5' nas células infectadas. Na nova posição na LTR-5' o gene está situado fora da unidade transcripcional retroviral.

O vetor N2A também é derivado do MoMLV porém o sítio de clonagem contendo os sítios de restrição Apa I, Bgl II, Sna BI, Sac I e Mlu I, se encontra dentro do U₃ da seqüência LTR-3' (69) (Fig. 5).

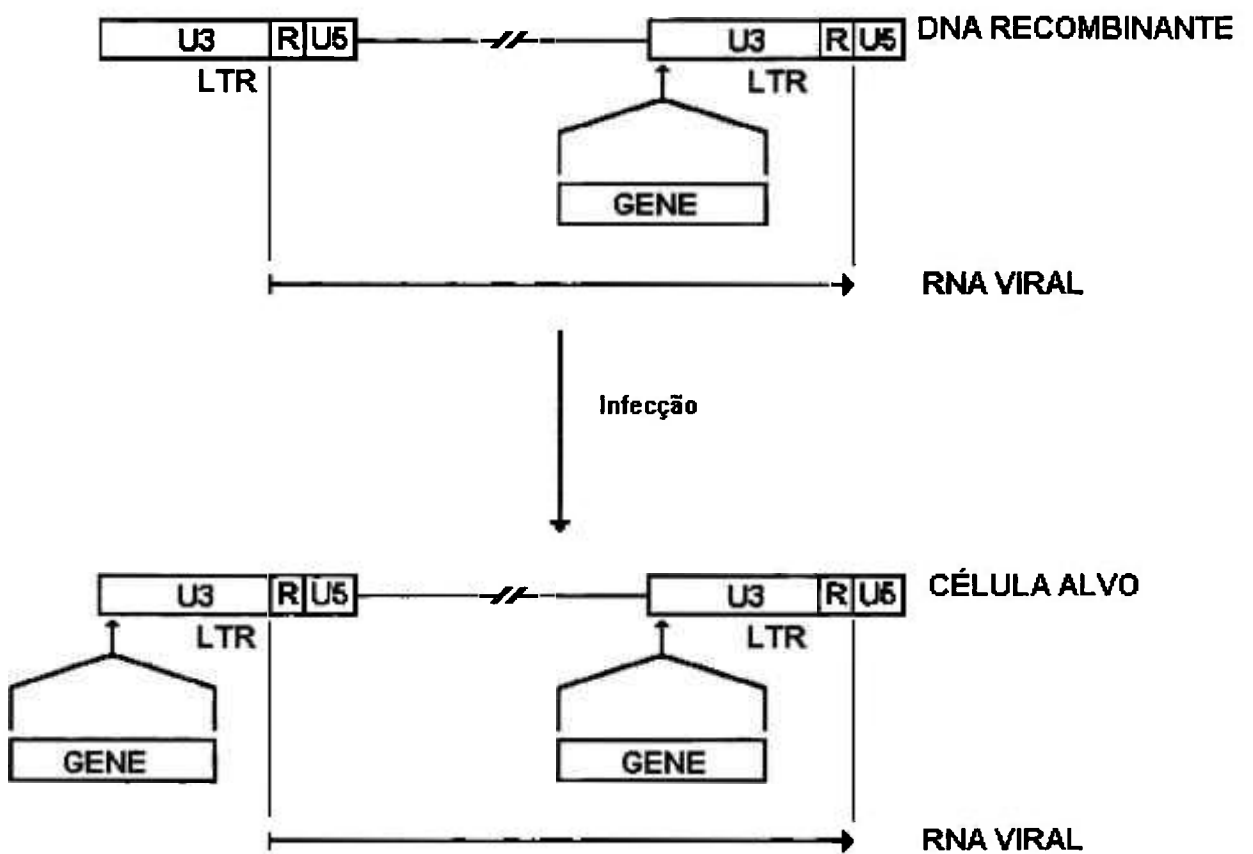


Fig. 5. Estrutura e princípio de funcionamento do vetor N2A.

11. Construção Retroviral

As construções retrovirais foram preparadas a partir do cDNA do gene de interesse (interleucina-6, promotor da metalotioneína e hormônio de crescimento), previamente retirados dos seus respectivos plasmídeos por digestão com enzimas de restrição. Paralelamente, os vetores retrovirais (LXSN e N2A) foram linearizados com enzimas de restrição, cujos sítios de digestão têm uma localização pré-determinada para a ligação com o cDNA de interesse.

A ligação do cDNA ao vetor retroviral foi feita por meio da enzima T₄ DNA ligase (BRL). Após confirmar a construção correta, por meio de digestões específicas e eletroforese em gel de agarose 1%, esta foi inserida por eletroporação em bactérias competentes DH-5 para amplificação e posterior purificação em coluna de afinidade (QIAGEN).

12. Seqüenciamento

O seqüenciamento da região de fusão entre o promotor da metalotioneína e o início da região de transcrição do cDNA do hGH foi feito com o kit "Sequenase", versão 2.0, da United States Biochemical (Ohio, USA), segundo método de Sanger e col. (133).

13. Transfecção em Células de Mamíferos

13.1. Eletroporação

Para o preparo de fibroblastos resistentes à geneticina, 1×10^7 células 3T3-J2 foram tripsinizadas, centrifugadas a 4°C e lavadas 3 vezes com DMEM sem soro. Estas células foram ressuspensas em 0,5 ml de DMEM e colocadas em uma cubeta de eletroporação a 4°C . Após a adição de 20 μg de DNA (pRSV5neo) foram efetuadas eletroporações em duas diferentes condições: 250 mV, 500 μF , 12,4 msec e 210 mV, 960 μF , 29 msec. Estas células foram semeadas em DMEM + 10% de soro bovino (SB), após 5 minutos de incubação no gelo. A seleção com geneticina começou 24 horas após a eletroporação (88).

13.2. Lipofectina

A lipofectina é um reagente comercial da GIBCO-BRL e foi utilizado misturando-se 50 μl do mesmo com 10 μg de DNA, completando-se o volume de 100 μl com H_2O . Esta mistura foi adicionada a 1 ml do meio de cultura opti-MEM sendo então adicionada às células aderentes, previamente lavadas com meio de cultura sem soro, de maneira a cobrir completamente as células. Após 24 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 , o meio de cultura foi trocado por KGM (meio para crescimento de queratinócitos) com 10% de SFB (72).

13.3. Polibreno

O Polibreno (Brometo de hexadimetrina-Aldrich, Milwaukee, USA) foi dissolvido em meio KGM (meio para crescimento de queratinócitos) sem soro, a uma concentração de 1 mg/ml, sendo então filtrado através de filtro de 0,22 μm para esterilização. As células foram lavadas com meio de cultura KGM sem soro.

O meio foi substituído por 400 µl de uma mistura de polibreno (10 µg/ml) e DNA (1,5 µg). As placas voltaram para o incubador por 6 horas com agitação ocasional. Ao final das 6 horas, o meio foi aspirado e as células foram submetidas a um choque com um meio de cultura contendo 27% de DMSO (dimetilsulfóxido), por 3 minutos em temperatura ambiente. Este meio foi novamente aspirado e as células lavadas 2 vezes com meio de cultura sem soro. Após 24 horas de incubação, em meio de cultura KGM com 10% de SFB foi iniciada a seleção com geneticina (G-418) 500 µg/ml (72).

13.4. Cloreto de Cálcio

As células de interesse foram cultivadas em placa de 60 mm até atingirem uma quantidade aproximada de 1×10^6 células. A transfecção foi iniciada após 5 horas da última troca de meio de cultura. Foram co-precipitados 10 µg de DNA com CaCl_2 2M em 2xHBS (NaCl 280 mM; KCl 10 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; Dextrose 12 mM e HEPES 50 mM). Esta mistura permaneceu exatamente 20' em incubação à temperatura ambiente, sendo então pipetada sobre a cultura de células. Procedeu-se a uma incubação de 16 horas a 37°C, 5% de CO_2 , trocando-se então o meio de cultura por 10 ml de DMEM + 10% SFB. Após 48 horas o sobrenadante foi retirado e congelado para posterior utilização (88) ou foi iniciada a seleção com geneticina (G-418).

14. Preparo de Células Produtoras

14.1. Transfecção e Infecção retroviral

As construções retrovirais foram introduzidas, primeiramente, nas células ecotróficas GP+E-86 (93), por meio de transfecção transiente com cloreto

de cálcio, por 20 min, com adição posterior de 5 ml de meio e incubação por 18 horas, e o sobrenadante desta foi utilizado para a infecção permanente das células anfotróficas GP+envAm12 (94), com posterior seleção com geneticina (0,8 mg de G-418/ml). A técnica de infecção consiste no contato, por um determinado período, do vírus com as células alvo. Os clones resistentes à neomicina foram amplificados e congelados e o sobrenadante testado pela dosagem da proteína de interesse.

14.2. Titulação

Os clones com maior produção de proteína foram titulados pela capacidade de infecção do sobrenadante em células NIH-3T3 (91).

Foram semeadas 50×10^3 células NIH-3T3 em placas de 28 cm^2 e adicionados 0,5 ml do sobrenadante dos clones a serem titulados, em diluições de 10^{-3} e 10^{-4} e 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno. Após 1 hora a 37°C , com agitação a cada 15 minutos, foram adicionados 4 ml de meio de cultura seguida de incubação por 18 horas. No dia seguinte foi iniciada a seleção com G-418. Após 10 dias procedeu-se à contagem dos clones, sendo o resultado expresso em unidades de formação de colônias por mililitro (ufc/ml).

15. Determinação da Atividade do Gene Transfectado ou Infectado

15.1. Ensaio de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)

Após 48 horas da transfecção do plasmídeo (pMCg/9) em queratinócitos (com o método da lipofectina), as células foram retiradas da placa com 1 ml de Tris-EDTA-NaCl (0,04M Tris-HCl pH 7,4 / 1 mM EDTA / 0,15 M NaCl), transferidas para um tubo de fundo cônico, centrifugadas por 10 segundos e aspirado o sobrenadante. As células foram então ressuspensas em 150 µl de Tris-HCl 0,25 M (pH 7,8). A lise das células foi efetuada com 5 ciclos de congelamento e descongelamento (banho de gelo seco e etanol por 5 minutos e banho a 37°C até descongelar). Foram misturados 20 µl de extrato a 130 µl de uma solução de ¹⁴C-Cloranfenicol (0,1 µCi), Tris-HCl (1 M, pH 7,8), Acetil-CoA (4 mM) e H₂O. Após uma incubação de 30', a 37°C, foi efetuada uma extração do cloranfenicol com 1 ml de acetato de etila e após a centrifugação a fase orgânica foi transferida para um tubo novo de fundo cônico. Após secar o acetato de etila a vácuo, a amostra foi ressuspensa em 30 µl de acetato de etila e aplicada a uma placa cromatográfica de camada delgada (65). A corrida foi efetuada em cuba cromatográfica sob saturação de clorofórmio:metanol (95:5). Após o final da corrida, a placa foi exposta contra um filme β-Max (Amersham), por 14 horas a -70°C (90).

15.2. Enzimaimunoensaio (ELISA)

Para a determinação da produção de interleucina-6 (IL-6) em meio de cultura celular, soro ou plasma, foi utilizado o kit "Quantikine - Human IL-6 Immunoassay" (R & D Systems, Inc.), com sensibilidade de 0,7 pg/ml, sendo a concentração máxima da curva padrão de 300 pg/ml. Este ensaio emprega a técnica quantitativa de enzimaimunoensaio com duplo anticorpo, sendo um anticorpo monoclonal, específico contra IL-6, imobilizado em uma fase sólida e um segundo anticorpo policlonal, também específico contra IL-6, conjugado a uma enzima que, quando em contato com um agente cromogênico, desenvolve uma coloração que é detectada em espectrofotômetro no comprimento de onda 450 nm. A determinação da concentração das amostras desconhecidas é feita lendo as densidades ópticas em uma curva obtida com amostras padrão de concentrações conhecidas versus suas respectivas densidades ópticas.

15.3. Radioimunoensaio (RIE)

A análise quantitativa do hormônio de crescimento humano (hGH) recombinante, produzido por queratinócitos infectados em cultura, foi feita pelo método de radioimunoensaio (RIE), padronizado no IPEN (124), com uma sensibilidade de 0,3 ng/ml. A técnica empregada foi a de incubação simultânea da amostra com o ^{125}I -hGH (marcado no IPEN) e o primeiro anticorpo anti-GH, por 18 horas a 4°C, utilizando o método de separação com um segundo anticorpo anti-IgG, adicionado à mistura por 2 horas, com posterior centrifugação para a obtenção do precipitado do complexo marcado, complexo este apresentando atividade (cpm) inversamente proporcional à quantidade de hGH presente na amostra. O padrão de hGH e o primeiro anticorpo (anti-GH humano produzido

em coelho) foi gentilmente fornecido pelo National Hormone and Pituitary Program/NIDDK (Rockville, MD, USA) e sendo o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho produzido em cabra) da firma TRILAB (São Paulo, Brasil). A detecção da radioatividade foi realizada em contador γ (COBRA 5000, Packard, Illinois, USA).

15.4. Fluoroimunoensaio (DELFA)

Para a determinação quantitativa de hormônio de crescimento humano (hGH) recombinante (baixa produção) em meio de cultura celular, foi utilizado o kit "DELFA hGH" (Wallac Oy, Pharmacia, Turku, Finlândia), com uma sensibilidade de 10 pg/ml (1), em colaboração com a CRIESP- Central de Radioimunoensaio de São Paulo. Este ensaio emprega a técnica quantitativa fluoroimunométrica com duplo anticorpo, sendo que os dois anticorpos são monoclonais, específicos contra dois diferentes determinantes antigênicos da molécula de hGH. Um dos anticorpos se encontra imobilizado em uma fase sólida funcionando para captura enquanto o segundo, marcado com Európio (^{152}Eu), funciona para a detecção. A determinação é feita em fluorômetro de tempo-resolvido pela leitura da fluorescência emitida, após a incubação da amostra com os anticorpos e posterior adição de uma solução intensificadora, que dissocia o Európio do anticorpo, formando quelatos altamente fluorescentes. A concentração das amostras desconhecidas é determinada lendo as intensidades de fluorescência (cps) em uma curva obtida com amostras padrão de concentrações conhecidas versus suas respectivas intensidades de fluorescência (139).

15.5. Teste Histoquímico para β -Galactosidase

15.5.1. Em células

Os queratinócitos semeados em placas de 24 poços foram lavados com PBS e fixados com 0,5 ml/poço de uma solução contendo 0,2% de glutaraldeído e 2% de formaldeído, por 5 minutos a 4°C. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS e incubados por 24 horas a 37°C com uma mistura de reação contendo: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosideo (X-gal) 1 mg/ml, hexaferricianato de potássio 5 mM, hexaferrocianato de potássio 5 mM e $MgCl_2$ 2 mM em PBS. O resultado é observado pelo desenvolvimento da cor azul nas células que contêm a enzima β -Galactosidase (57).

15.5.2. Em cortes histológicos

O procedimento acima citado é também utilizado para verificação da presença de β -Galactosidase em cortes histológicos da epiderme humana enxertada em camundongos atímicos, sendo que a reação é efetuada em tubo de ensaio contendo a biópsia da pele retirada do camundongo. Após o término da reação, a biópsia é novamente fixada, inserida em bloco de parafina para proceder aos cortes histológicos com posterior fixação dos mesmos em lamina e retirada da parafina com lavagens sucessivas de Xilol, álcool absoluto, álcool 95%, álcool 90%, solução de Iodo-Iodeto de potássio, álcool 90% e H_2O , com posterior coloração com hematoxilina e eosina para a visualização das células negativas. O preparo dos cortes histológicos e a sua análise foi uma gentileza do Dr. Adriano T. Franzi e colaboradores do Istituto di Anatomia Umana Normale, Università di Genova, Gênova, Itália.

15.6. Western Blotting

Para a determinação qualitativa do hGH recombinante, foi realizado o Western blotting seguindo-se basicamente a técnica de Burnette (23) e utilizando-se antissoro anti-hGH produzido em coelho (IPEN/CNEN-São Paulo, Brasil) e ¹²⁵I-Proteína A.

15.6.1. SDS-PAGE

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (80), sob condições não redutoras, para posterior transferência.

15.6.2. Transferência

A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do gel em cuba de transferência (LKB 2117-250 Multiphor II NOVABLOT, Pharmacia, Upsalla, Suécia), com eletrodos de grafite, utilizando-se papel de filtro 3MM embebido em tampão de transferência (Glicina 39 mM, Tris 48mM, SDS 0,0375%, Metanol 20%, em solução aquosa), em contato direto com os eletrodos, filtro de nitrocelulose (Nitrocellulose Membrane 0,45 µm, Pharmacia) sobre o papel de filtro próximo ao polo positivo e o gel entre filtro e o papel de filtro próximo ao polo negativo. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, segundo a fórmula (estipulada pelo fabricante): Corrente aplicada (mA) = área (cm²) x 0,85. A transferência foi realizada em uma hora e meia.

15.6.3. Imunorreação

O filtro de nitrocelulose foi tratado por uma hora com tampão fosfo-salino (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico-Nestlé, São Paulo, Brasil) e posteriormente incubado por 18 horas em temperatura ambiente com 50 ml de antissoro anti-hGH diluído 1:100 em PBS + 5% de leite em pó. Após a incubação com o antissoro, foram feitas 5 lavagens de meia hora com 50 ml de PBS + 5% de leite em pó. A incubação com ¹²⁵I-Proteína A foi realizada por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação, com 50 ml de solução contendo 200.000 cpm/ml deste traçador em PBS + 5% de leite em pó. Foram feitas seis lavagens com PBS contendo 0,01% de Tween 20.

15.6.4. Autorradiografia

Após a imunorreação, o filtro foi colocado em chassis contendo filme radiográfico (Kodak) e placas intensificadoras, para exposição, por aproximadamente, 6 horas a -70°C e posterior revelação do filme.

16. *Enxerto de Células Epidérmicas em Cultura*

Foram usadas culturas de queratinócitos após confluência. As células foram lavadas com meio de cultura sem soro e incubadas com uma protease neutra, denominada Dispase II (Boehringer Mannheim) numa concentração de 2,5 mg/ml, cuja função é destacar as células da parede da placa sem contudo dissociar as células entre si (66). O epitélio destacado foi lavado duas vezes com meio de cultura sem soro, removido totalmente e acondicionado em gaze não aderente (Adaptic - Johnson & Johnson) (Fig. 6). Pedacos retangulares de borracha siliconizada (Silastic - Dow Corning), foram lavados e esterilizados. Os camundongos atímicos foram anestesiados com injeção subcutânea de fenobarbital (0,038 mg/g do animal) e Xylazine (0,075 mg/g do animal). O procedimento cirúrgico foi efetuado em condições estéreis, cortando a pele do dorso do animal em 3 lados deixando o quarto (Fig. 7). A Silastic foi acondicionada sobre o músculo do animal, sobre esta foi colocado o enxerto de maneira a permanecer o lado basal da cultura na face superior e a pele do animal foi novamente "fechada" sobre a epiderme humana, sendo suturada com prendedores cirúrgicos (Fig. 8). Durante um período que variou de 3 a 67 dias os animais foram sacrificados com vapores de dióxido de carbono e os pedaços de pele contendo o enxerto foram cortados e fixados (Fig. 9). Posteriormente os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (8).

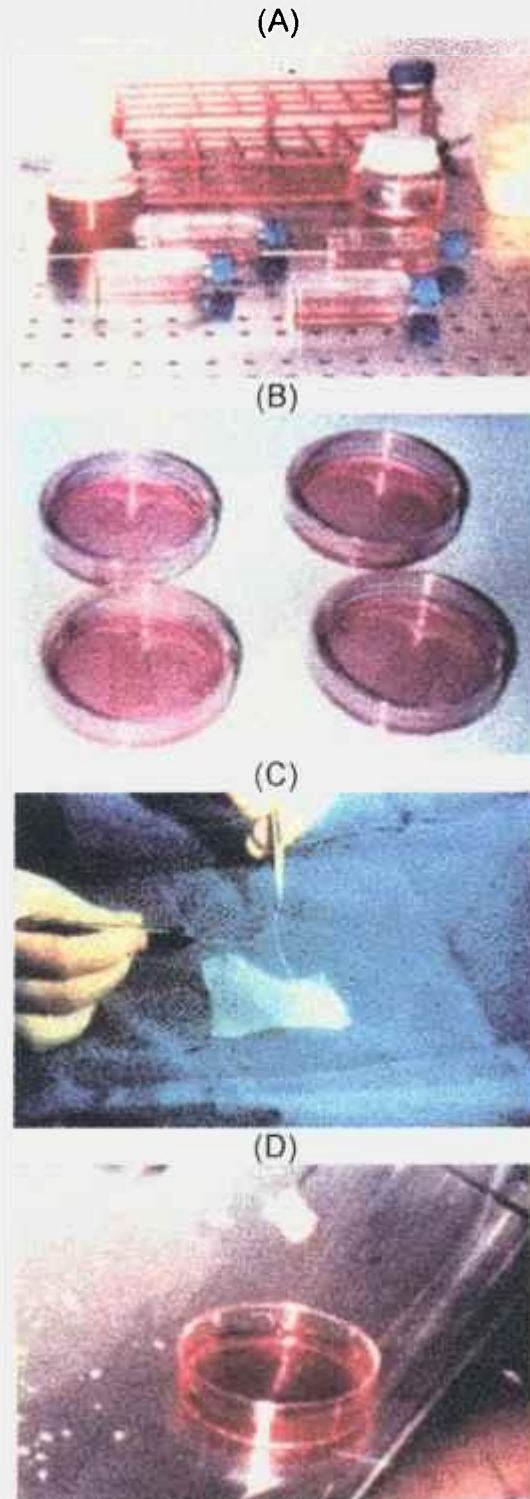


Fig. 6. Preparo do enxerto para o implante. (A) Crescimento de queratinócitos em frascos T25 até a confluência, a partir de cultura primária; (B) Membrana epitelial após tratamento com Dispase; (C) Montagem da membrana em gaze não aderente e (D) Enxerto pronto para o implante.

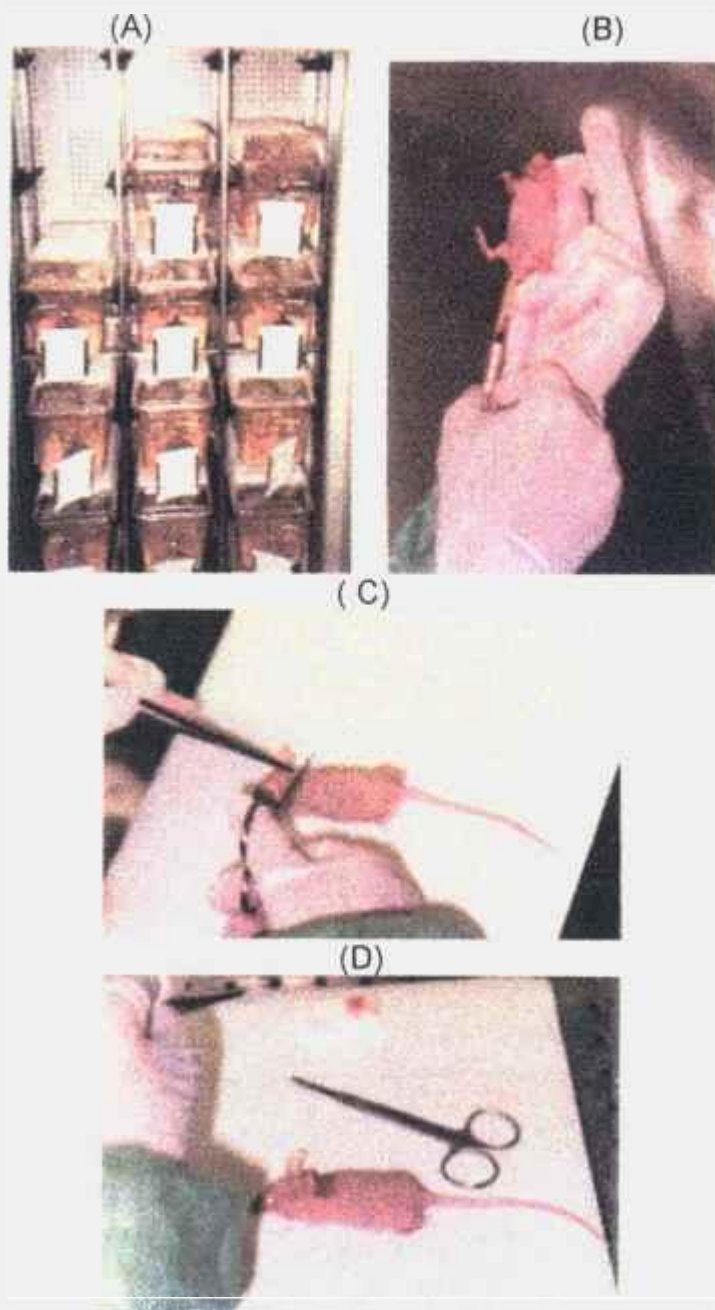


Fig. 7. Preparo do camundongo. (A) Armário climatizado e gaiolas estéreis para a manutenção dos camundongos; (B) Injeção de relaxante muscular e anestésico; (C e D) corte da pele do dorso em 3 lados.

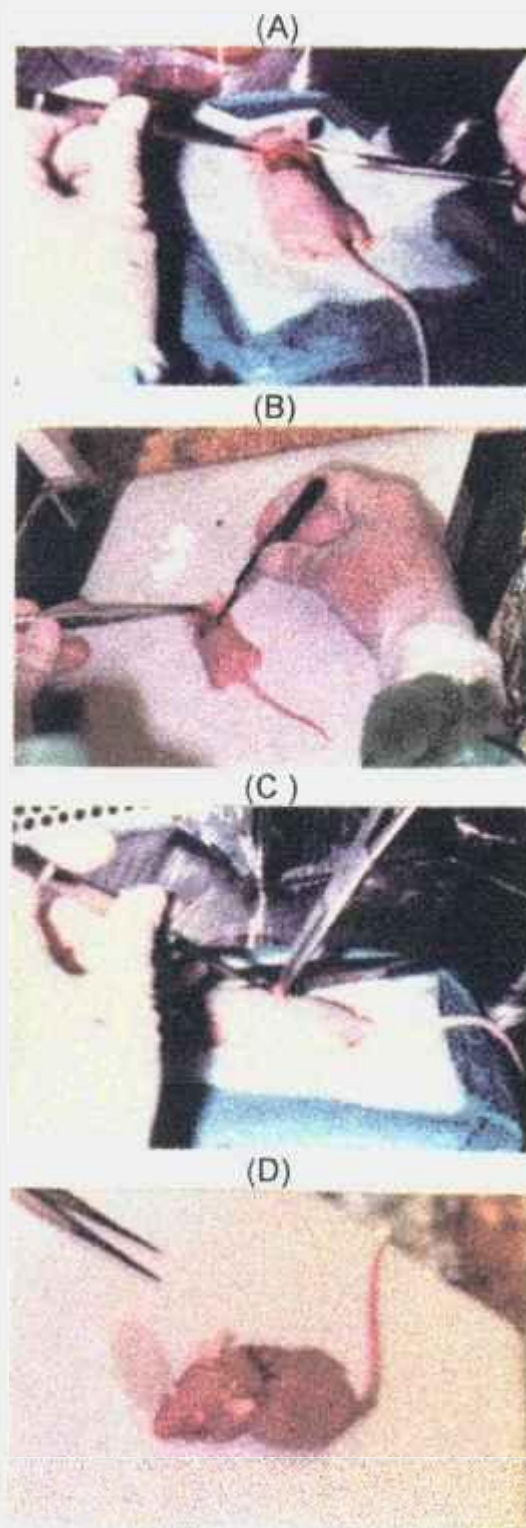


Fig. 8. Implante do enxerto. (A) Deslocamento da pele; (B) Adição da membrana inerte (Silastic) sobre o músculo e do enxerto com a membrana basal voltada para a derme do camundongo; (C e D) Sutura da pele por meio de grampos metálicos.

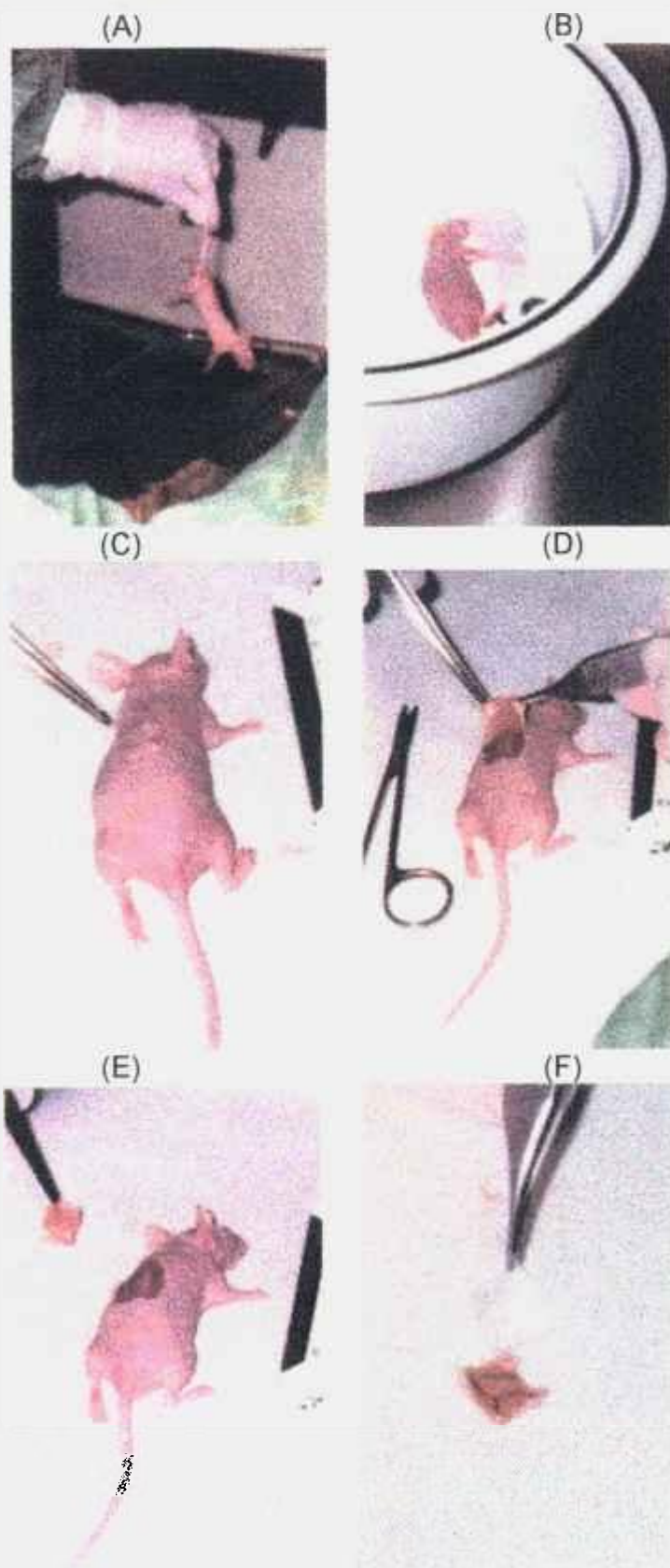


Fig. 9. Retirada do enxerto. (A e B) Camundongo sacrificado com gases de CO_2 ; (C) Pele totalmente cicatrizada contendo o enxerto no seu interior; (D) Corte da pele; (E e F) retirada da membrana inerte e dos grampos.

RESULTADOS

1. Estudo do comportamento dos queratinócitos, quando expostos a metais como Zinco e Cádmio

Nesta etapa foi efetuada a determinação das células vivas por meio da coloração vital (ensaio com Vermelho Neutro) após a adição de Zinco ou Cádmio (Zn^{+2} , Cd^{+2}), em concentrações (Fig. 10 e 11) e tempos (Fig. 12) variados, sendo também feito um estudo visual da variação morfológica dos queratinócitos (Tabela 1), utilizando as mesmas condições dos estudos anteriores.

1.1. Verificação por coloração da toxidez do Zinco e Cádmio em queratinócitos em crescimento exponencial, variando as concentrações destes metais

Com as culturas de queratinócitos ainda em crescimento exponencial (4 a 5 dias), foi efetuado o experimento de ativação, adicionando concentrações de Zinco e Cádmio variando de 5 μ M a 10 mM e mantendo-as por 10 horas até troca por meio de cultura isento destes metais. Após 24 horas foi efetuada a coloração e às absorbâncias (equivalentes às células vivas) comparadas à absorbância obtida na cultura controle não ativada (Fig. 10).

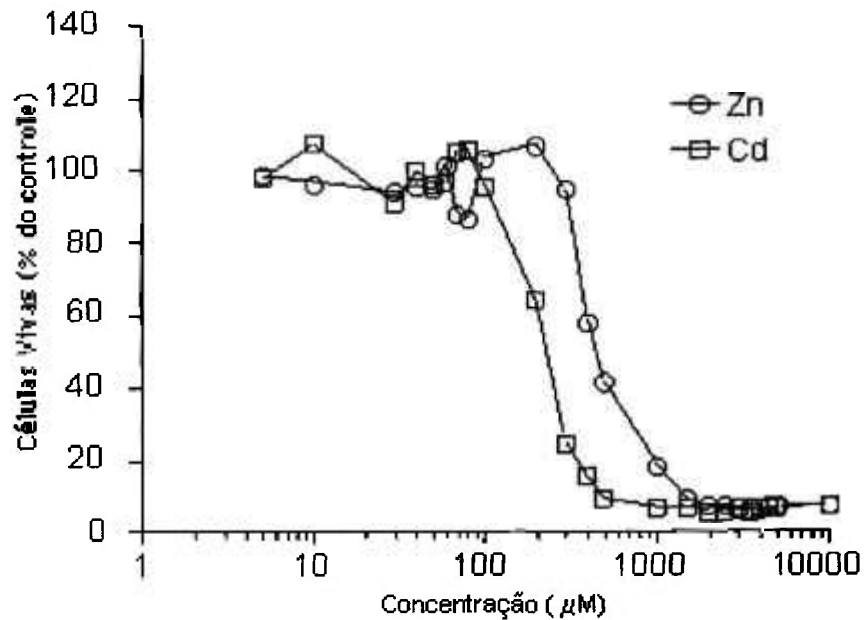


Fig.10. Quantidade (em % do controle) de células vivas (ensaio com Vermelho Neutro) determinada após 24 horas do início do experimento, porém trocando o meio de cultura após 10 horas de ativação. O experimento foi efetuado com cultura de queratinócitos em crescimento exponencial.

1.2. Verificação por coloração da toxidez do Zinco e Cádmio em queratinócitos confluentes, variando as concentrações destes metais

Com as culturas de queratinócitos confluentes a 3 dias (10 a 11 dias), foi repetido o experimento de ativação anterior, adicionando as mesmas concentrações de Zinco e Cádmio (variando de 5 μM a 10 mM) e mantendo-as por 10 horas com posterior troca de meio de cultura isento destes metais. Após 24 horas a determinação foi realizada como descrito no item anterior (Fig. 11).

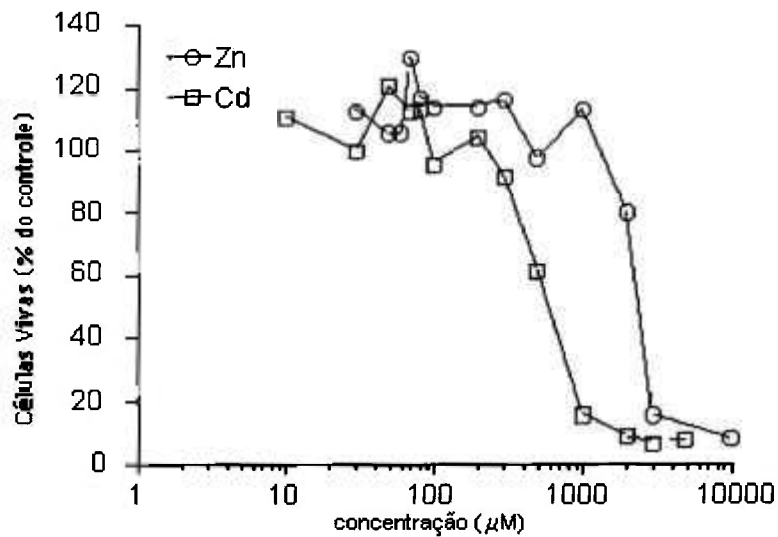


Fig.11. Quantidade (em % do controle) de células vivas (Ensaio com Vermelho Neutro) determinada após 24 horas do início do experimento, porém trocando o meio de cultura após 10 horas de ativação. O experimento foi efetuado com cultura de queratinócitos confluentes a 3 dias.

1.3. Verificação da toxidez do Zinco em queratinócitos, em crescimento exponencial, variando o tempo de exposição a estes metais

Confirmada a maior toxidez do Cádmio em relação ao Zinco e sabendo-se que este último é mais fisiológico, continuamos os experimentos somente com o Zinco. Para este experimento foram utilizadas culturas de queratinócitos em crescimento exponencial (4 a 5 dias) e a ativação foi mantida por tempos variando de 30 minutos a 14 horas. A concentração fixada para este experimento foi de 100 μM, pois segundo os testes anteriores seria a mais alta sem a diminuição de células vivas, tanto em culturas de queratinócitos em crescimento exponencial como após confluência (Fig. 12). O experimento foi repetido, para confirmação, com Zn^{+2} 50 e 500 μM .

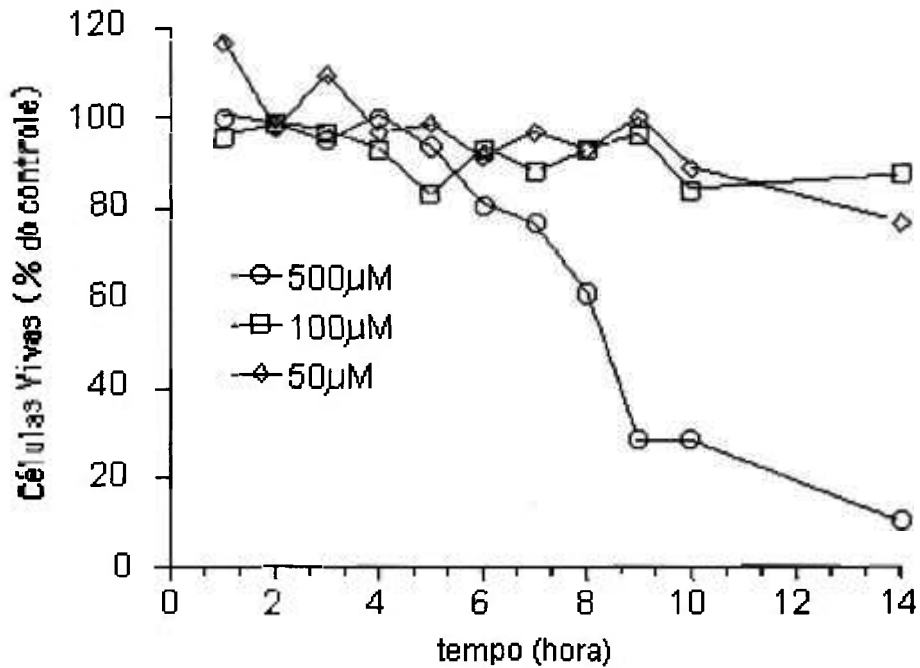


Fig.12. Quantidade (em % do controle) de células vivas (Ensaio com Vermelho Neutro) determinada após 24 horas do início do experimento, porém trocando o meio de cultura após cada ativação. O experimento foi efetuado com cultura de queratinócitos em crescimento exponencial e as ativações efetuadas com 3 diversas concentrações de Zn^{+2} : (○) 500 μM , (□) 100 μM e (◇) 50 μM .

1.4. Verificação visual da toxidez do Zinco em queratinócitos, em crescimento exponencial, variando as concentrações deste metal

Em paralelo aos testes anteriores, foi feita a verificação visual ao microscópio das alterações morfológicas (com o passar do tempo) das células quando ativadas com concentrações de Zinco variando de 5 μM a 10 mM. O resultado foi expresso em quantidades crescentes de cruzes indicando o aumento de alteração morfológica, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Verificação visual, de hora em hora ao microscópio.

ZnCl ₂ (μ M)	Tempo de Ativação (horas)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	24*
10000	++++	++++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
5000	++++	+++++	++++	++++	+++	+++	++	++	++	++	++
4500	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	++	++	++
4000	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++	++
3500	++	++++	+++++	+++++	+++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
3000	+	+++	++++	+++++	†	†	+++++	+++++	+++++	++++	++++
2500	-	++	+++	++++	†	†	†	+++++	+++++	†	+++++
2000	-	++	++	++++	†	†	†	†	†	†	†
1500	-	+	++	++++	+++++	†	†	†	†	†	†
1000	-	+	+	+++	+++++	†	†	†	†	†	†
500	-	-	-	++	+++	+++++	†	†	†	†	†
400	-	-	-	+	++	+++	+++++	†	†	†	†
300	-	-	-	+	-	+	++	+++	†	†	†
200	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	-
100	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-
80	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
70	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- nenhuma alteração
- + início de alteração morfológica
- ++ aumento do espaço intercelular
- +++ aumento do espaço intercelular e perda parcial da visualização do núcleo
- ++++ perda completa da visualização do núcleo
- +++++ perda da aderência das células ao fundo da placa (parecendo totalmente destruídas)
- † MORTE APARENTE

* troca de meio (sem Zinco) após 10 horas de ativação

Com estes experimentos tivemos os primeiros indícios para utilizar o Zinco (na forma ZnCl₂) na concentração de 100 μ M por um período de 10 horas.

2. Verificação da variação da quantidade de mRNA da metalotioneína nos queratinócitos quando ativados com metais, para constatação do funcionamento do mecanismo de ação do promotor de metalotioneína

Nesta etapa foram analisados os mRNA da metalotioneína e da proteína "heat shock " para confirmação das condições de ativação dos mesmos variando concentração e tempo de contato com Zinco.

2.1. Variação de concentração de Zinco

Foi realizada a determinação dos mRNA de metalotioneína e "heat shock" em queratinócitos ativados com concentrações variadas de Zinco (Fig. 13 e 14). A finalidade deste experimento foi determinar a maior concentração de $ZnCl_2$ que pode ser utilizada sem causar dano à célula (confirmando os experimentos dos itens 1.1 e 1.2).

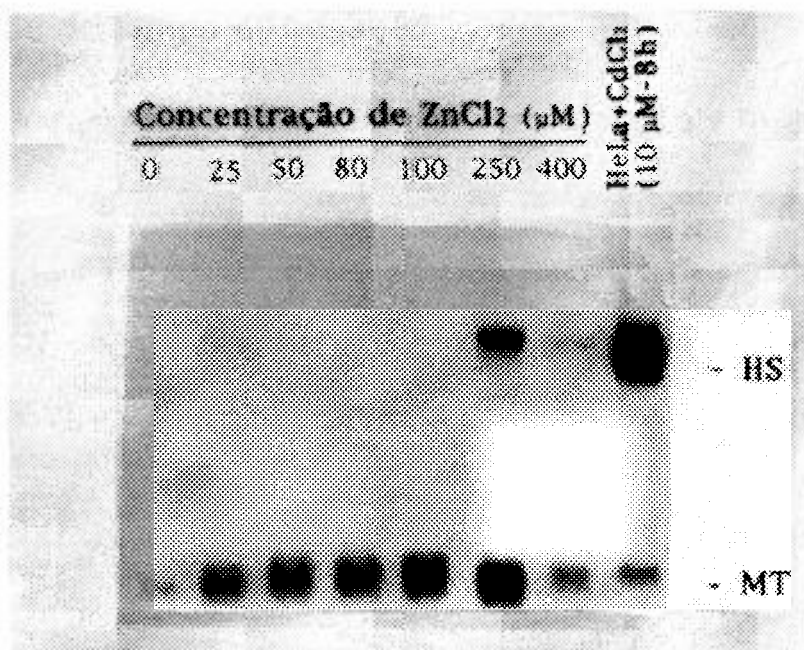


Fig.13. "Northern Blot", com a utilização de sondas que se ligam aos mRNAs da proteína "heat shock 70" e da metalotioneína. Foram utilizadas concentrações de ZnCl₂ variando de 0 a 400μM.

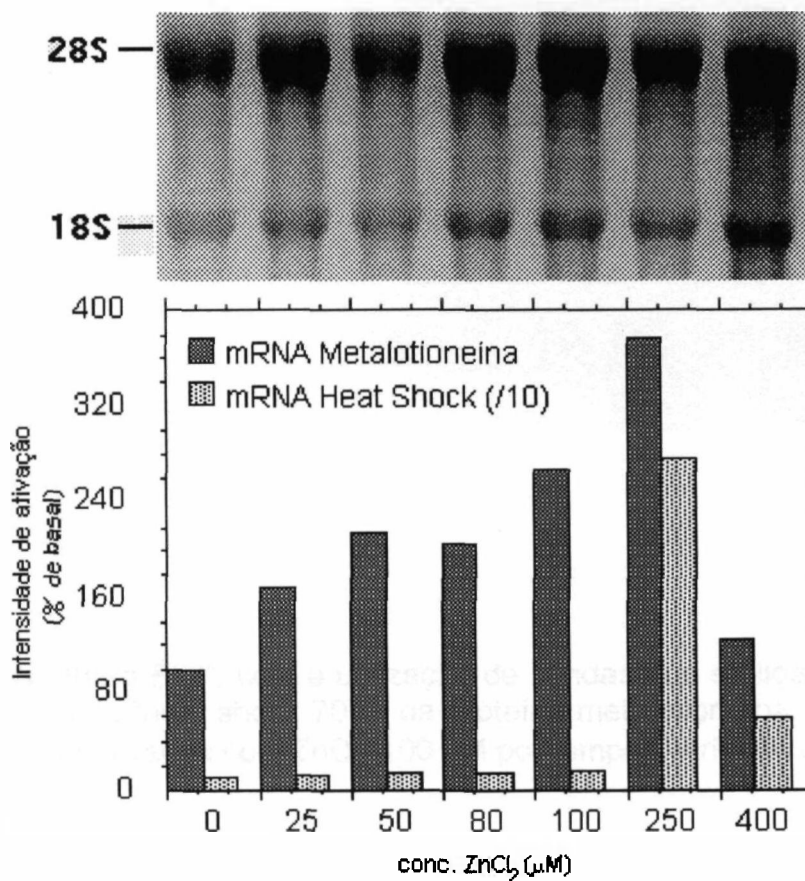


Fig.14. Comparação dos mRNAs após ativação com várias concentrações de ZnCl₂ e normalização das quantidades de RNA total (pelo método da densitometria da fração 18S), expressas em % do controle basal.

2.2. Variação do tempo de ativação

A determinação dos mRNA de metalotioneína e "heat shock", em queratinócitos ativados com Zinco 100 μ M foi realizada variando o tempo de ativação (Fig. 15 e 16). A finalidade deste experimento foi determinar por quanto tempo o ZnCl₂ deve permanecer em contato com a célula (confirmando o experimento do item 1.3.).

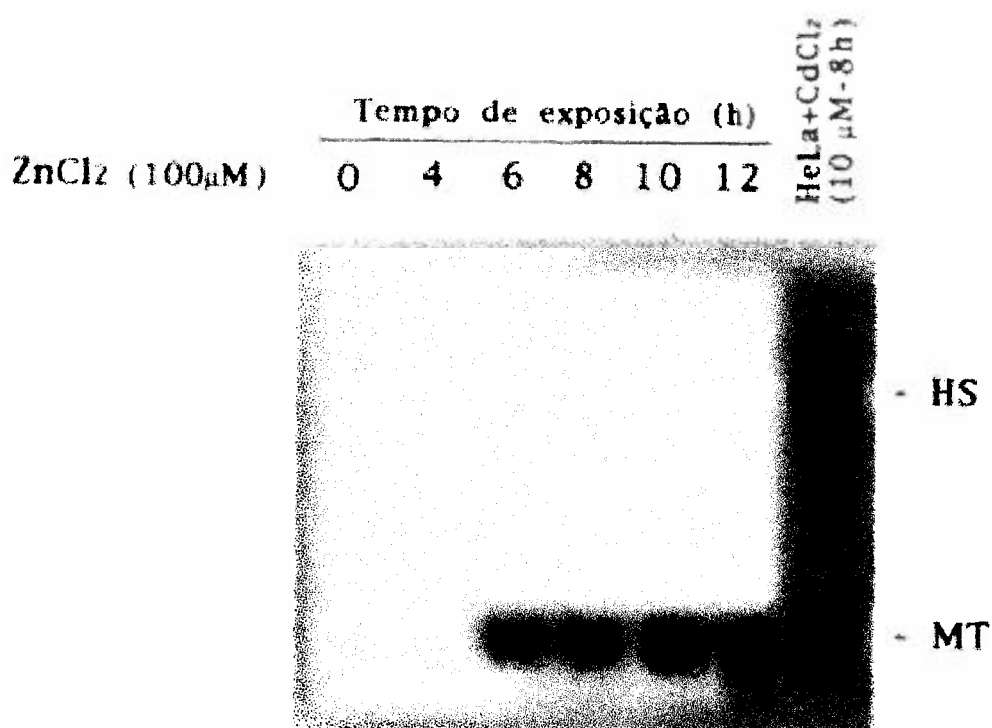


Fig.15. "Northern Blot", com a utilização de sondas que se ligam aos mRNAs da proteína "heat shock 70" e da proteína metalotioneína. Os queratinócitos foram ativados com ZnCl₂ 100 μ M por tempos variando de 0 a 12 horas.

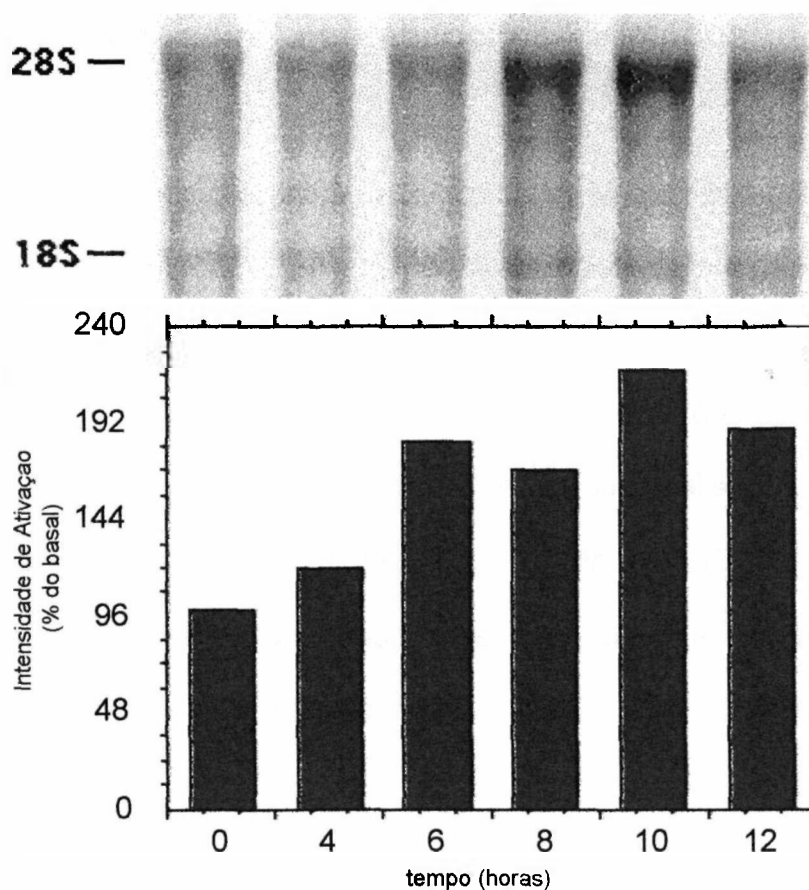


Fig.16. Comparação dos mRNAs após ativação com ZnCl_2 100 μM durante tempos diferentes e normalização das quantidades de RNA total (pelo método da densitometria da fração 18S), expressas em % do controle basal.

Os dados apresentados nos itens **2.1.** e **2.2.** mostraram que obtivemos uma boa ativação do mRNA da metalotioneína com ZnCl_2 100 μM durante 10 horas, sem contudo, causar dano às células, como se observa pela ausência do mRNA que codifica para a proteína "heat shock-70" (proteína que aparece em situação de "stress" celular).

2.3. Comparação entre queratinócitos primários de diferentes indivíduos

Tendo como objetivo saber como varia o mRNA da metalotioneína de um indivíduo para outro, já que não trabalharemos com linhagem celular, foram analisados os mRNA da metalotioneína e da "heat shock 70" dos queratinócitos (culturas primárias) de doadores com idade variando de recém nascido até 65 anos (Tabela 2). Os mRNAs foram analisados nas condições anteriores, após ativação das células com 100 μM de ZnCl_2 , por 10 horas; no experimento, as amostras foram aplicadas em ordem de idade crescente da esquerda para a direita (Fig. 17 e 18).

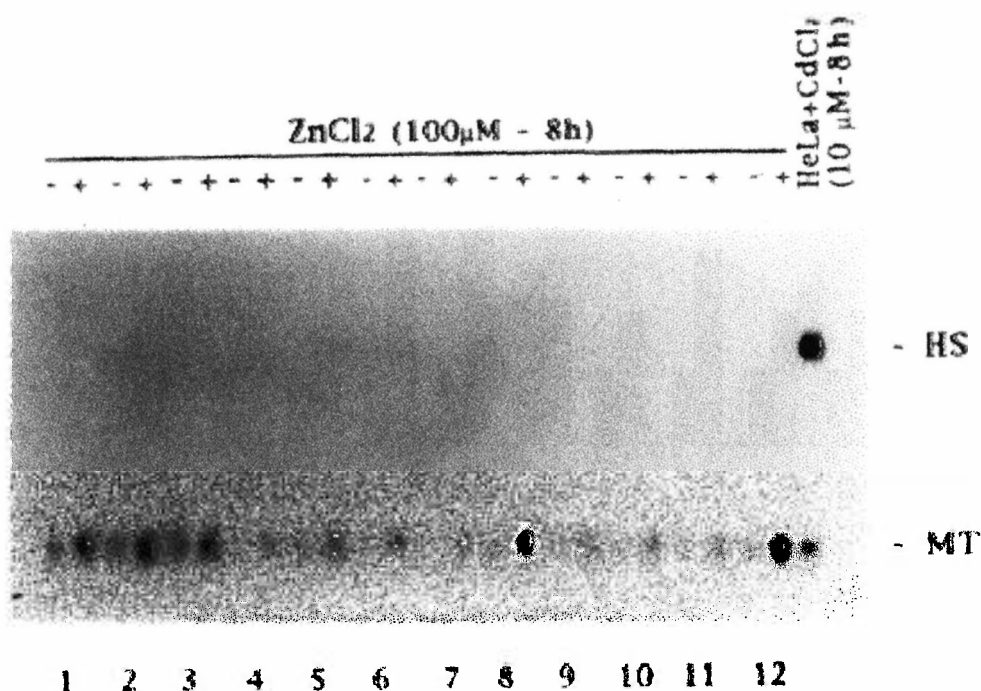


Fig.17. "Northern Blot", com a utilização de sondas que se ligam aos mRNAs da proteína "heat shock 70" e da proteína metalotioneína. Os queratinócitos foram ativados com ZnCl_2 100 μM por 10 horas. Cada par de colunas corresponde a um doador, sendo que a primeira é sempre o controle e a segunda é o ativado.

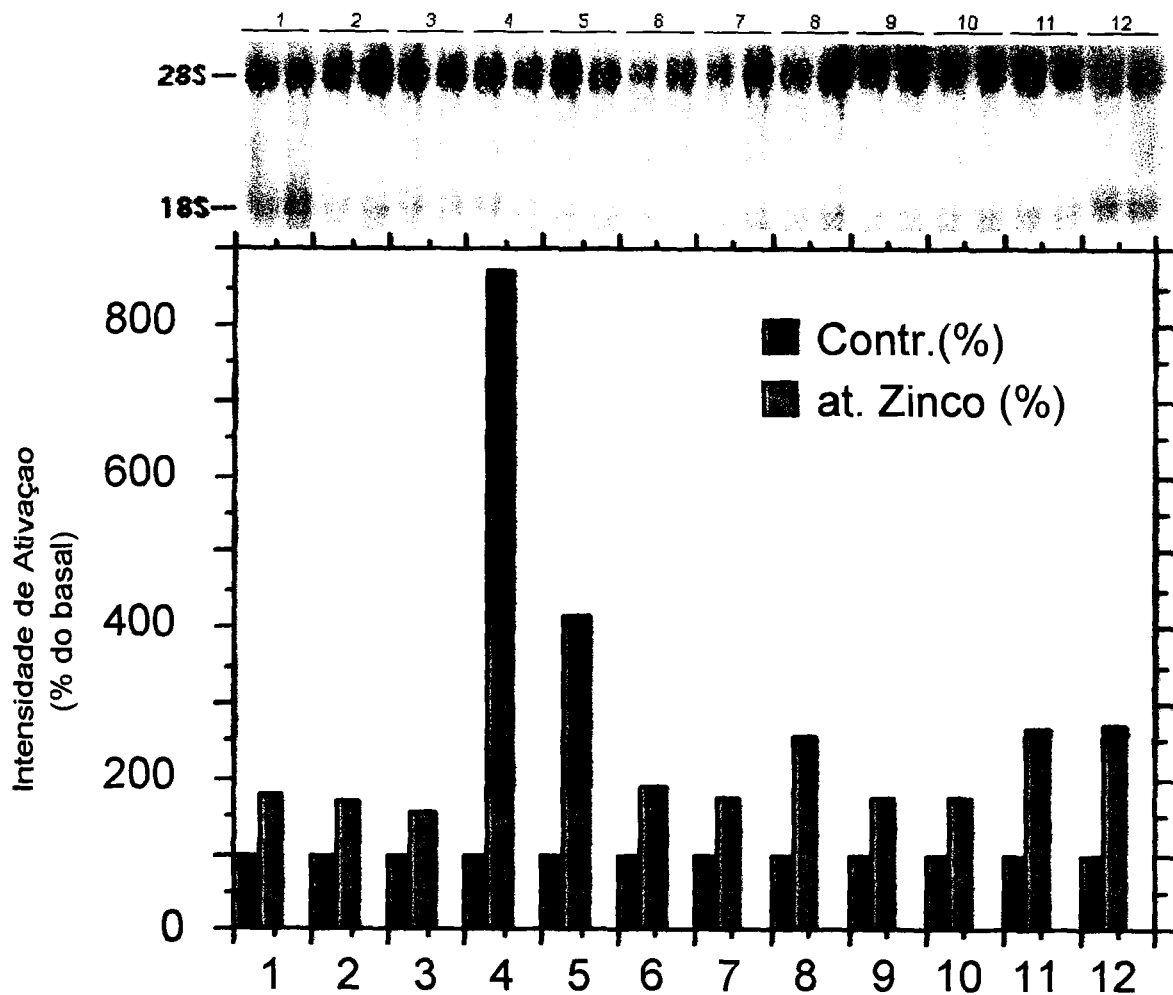


Fig.18. Comparação dos mRNAs de diferentes indivíduos após ativação e normalização das quantidades de RNA total adicionadas (pelo método da densitometria da fração 28S), transformadas em % do controle basal.

Tabela 2. Idade e sexo dos doadores

DOADOR	IDADE	SEXO
1	recém nascido	masculino
2	recém nascido	masculino
3	18 meses	masculino
4	2 anos	feminino
5	10 anos	feminino
6	14 anos	masculino
7	19 anos	masculino
8	19 anos	feminino
9	38 anos	masculino
10	44 anos	masculino
11	57 anos	feminino
12	65 anos	masculino

Com este experimento concluimos que a quantidade de metalotioneína basal, assim como a sua intensidade de ativação varia de doador para doador, sendo independente do sexo e da idade.

3. Preparo de uma linhagem de fibroblastos resistentes ao antibiótico que será utilizado para selecionar os queratinócitos transfectados. Verificação da eficiência destes fibroblastos quando utilizados como "feeder layer"

Prevendo-se a provável utilização dos queratinócitos transfectados, fez-se necessário determinar a concentração de antibiótico a ser utilizada e o preparo de uma linhagem de fibroblastos resistentes a este antibiótico, para ser utilizada como camada de sustentação, sem que esta seja afetada durante a seleção.

3.1. Concentração ideal do antibiótico

Foram estudados dois antibióticos, geneticina e higromicina, com o intuito de determinar a concentração de antibiótico a ser utilizada para seleção das células transfectadas. As tabelas 3 e 4 indicam a toxidez, respectivamente, de Geneticina (G-418) e Higromicina para os queratinócitos; o parâmetro "MORTE CELULAR" foi considerado como sendo o tempo necessário para não se encontrar nenhuma célula viva em cultura.

Tabela 3. Toxidez (em função da concentração) de Geneticina adicionada às culturas de queratinócitos.

MORTE CELULAR (dias)	GENETICINA - G418 ($\mu\text{g/ml}$)														
	1000	750	500	250	200	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10
	1	1	2	3	5	7	7	8	9	10	10	>10	>10	>10	>10

Tabela 4. Toxidez (em função da concentração) de Higromicina adicionada às culturas de queratinócitos.

MORTE CELULAR (dias)	HIGROMICINA ($\mu\text{g/ml}$)															
	1000	500	100	80	60	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,10	0,01	
	1	1	1	1	2	2	4	8	10	10	10	10	>10	>10	>10	

A concentração ideal de geneticina (G-418) a ser usada para a seleção dos queratinócitos transfectados, resistentes ao antibiótico, foi de 500 $\mu\text{g/ml}$ e a da higromicina foi de 50 $\mu\text{g/ml}$. Estas são as concentrações que destroem todas as células não resistentes, em dois dias. Este tempo de dois dias foi escolhido como sendo o período ideal pela praticidade metodológica sem a utilização de concentrações excessivamente altas do antibiótico.

3.2. Fibroblastos resistentes à geneticina

Apesar de termos acesso à linhagem de células NIH-3T3 resistentes a geneticina, decidimos pela obtenção de uma linhagem resistente derivada de fibroblastos 3T3-J2, pois era sabido que, nas mesmas condições, a camada de sustentação constituída de células NIH-3T3 apresentavam um menor rendimento no crescimento dos queratinócitos.

Após a transfecção, por eletroporação, da linhagem de fibroblastos (3T3-J2) com o plasmídeo (pRSV5neo) que confere resistência à neomicina, foram obtidos dois clones, dos quais derivaram duas linhagem celulares resistentes ao antibiótico.

- 3T3-J2RA: Na primeira condição (250 mV, 500 mF, 12,4 msec), após a seleção com 500 mg de G-418/ml, algumas células sobreviveram e se multiplicaram lentamente.
- 3T3-J2RB: Na segunda condição (210 mV, 960 mF, 29 msec), após a seleção com 500 mg de G-418/ml, poucas células sobreviveram, porém se multiplicaram rapidamente.

Estes clones, assim como uma linhagem de células NIH-3T3 resistentes à geneticina, foram testados pela eficiência de formação de colônias (**EFC**) (Fig. 19) e crescimento de população celular (**CC**) (Fig. 20), usando como referência as células 3T3-J2.

3.2.1. Eficiência de Formação de Colônias (EFC)

Para avaliar o crescimento de queratinócitos segundo o parâmetro EFC (Fig.19), foram semeados 230.000 fibroblastos, por placa de 9,6 cm², das linhagens 3T3-J2, 3T3-J2RA e 3T3-J2RB, enquanto as células NIH-3T3 foram semeadas com a mesma quantidade e em quantidades dupla e tripla. Os queratinócitos foram semeados na mesma concentração em todas as placas (1000 células por placa de 9,6 cm²).

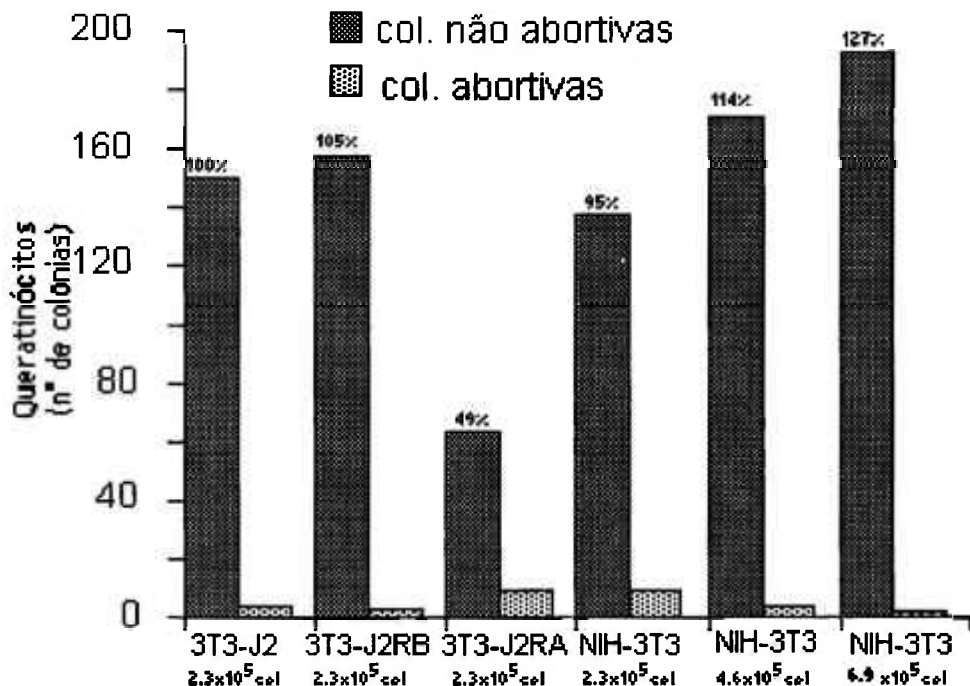


Fig.19. Comparação das linhagens celulares resistentes à geneticina, utilizadas como camada de sustentação para o crescimento de queratinócitos, considerando como 100% o número de colônias de queratinócitos obtidas quando em crescimento sobre as células 3T3-J2. São consideradas colônias abortivas aquelas que apresentam bordas disformes e pequenas dimensões provocadas pela aceleração do processo de diferenciação.

3.2.2. Crescimento de população celular (CC)

O crescimento de queratinócitos humanos normais em diferentes camadas de sustentação, definido segundo o parâmetro **CC** é apresentado na figura 20.

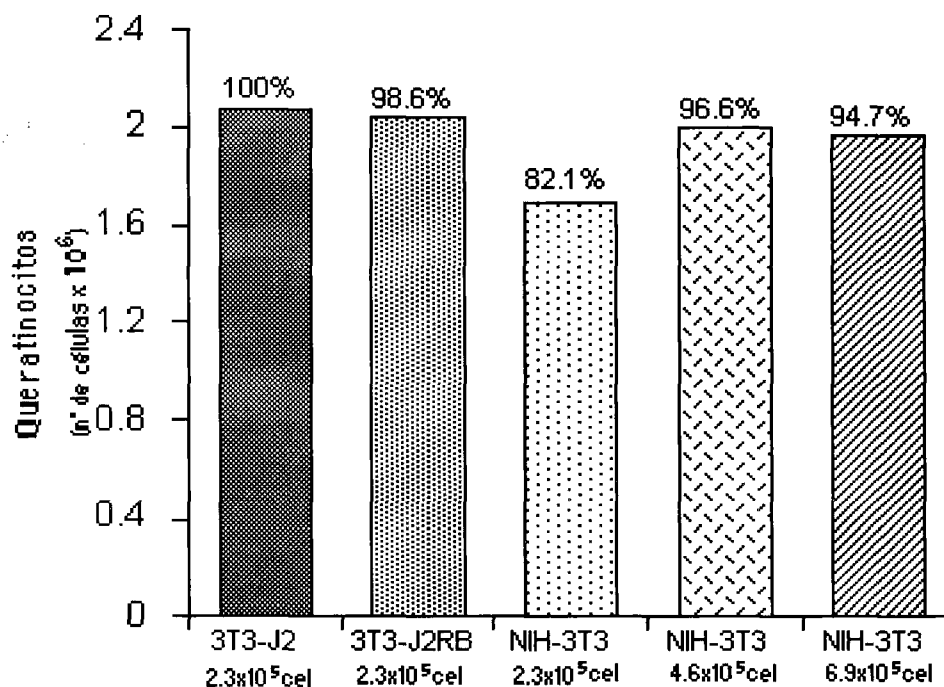


Fig.20. Comparação das linhagens celulares resistentes à geneticina, utilizadas como camada de sustentação para o crescimento de queratinócitos, considerando como 100% o número de queratinócitos obtidos quando em crescimento sobre as células 3T3-J2.

Chegamos à conclusão que dos dois clones por nós obtidos, somente o 3T3-J2RB (Fig. 19 e 20) é comparável às células que lhe deram origem no que diz respeito à sua utilização como camada de sustentação no processo de seleção após a transfecção dos queratinócitos, e que a linhagem NIH-3T3 resistente a geneticina pode ser usada desde que com o dobro de células normalmente usadas com a linhagem celular 3T3-J2.

4. Transfecção e co-transfecção dos plasmídeos que contém os cDNAs do gene da resistência à neomicina (pRSV5neo), da metalotioneína (pHMTIIA), do gene CAT (pMCg/9) e do hormônio de crescimento humano (phGH6A).

4.1. Transfecções Permanentes

Foram efetuadas inicialmente transfecções e co-transfecções dos plasmídeos pHMTIIA, phGH6A e pRSV5neo em queratinócitos, utilizando tanto o método da lipofectina como o método do polibreno e selecionando posteriormente com G-418, com o objetivo de conseguir uma transfecção permanente.

Após várias tentativas, tais como:

- transfecção no momento de semear os queratinócitos;
- transfecção após 3 dias de cultura (crescimento exponencial);
- transfecção após 6 dias de cultura (semiconfluência);
- transfecção e posterior tripsinização, semeando estas células em nova camada de sustentação,

sempre sem nenhum resultado após a seleção, nos convencemos das dificuldades em obter queratinócitos permanentemente transfectados. Para todos os testes foram utilizados plasmídeos purificados pelo método do duplo

bandeamento em gradiente de CsCl. A co-transfecção dos mesmos plasmídeos em fibroblastos foi utilizada como controle, obtendo-se células resistentes à geneticina, ainda que com baixo rendimento (~1%).

Foi demonstrado que a técnica de transfecção permanente não forneceu resultados positivos nos queratinócitos humanos normais, levando-nos a considerar a infecção viral como uma alternativa viável para nossos objetivos.

4.2. Transfecção transiente

Para confirmar se a transfecção de queratinócitos se dá, pelo menos, de forma transiente foi utilizado como marcador o plasmídeo contendo o DNA do gene CAT (pMCg/9) (Fig. 21). Este gene codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) bacteriana, a qual promove a transferência de grupos acetila da acetil coenzima A para o cloranfenicol, inativando-o e tornando a bactéria resistente a esse antibiótico.

A atividade da enzima cloranfenicol acetil transferase, produzida pelo gene bacteriano CAT, é diretamente proporcional à produção de seu mRNA e, conseqüentemente, ao rendimento de transfecção. Esta atividade é facilmente mensurável, pois a intensidade de acetilação pode ser seguida utilizando-se na reação cloranfenicol marcado com ^{14}C e posterior cromatografia de camada delgada e autorradiografia para visualizar a diferença de migração entre o cloranfenicol acetilado e o não acetilado (ausência da enzima). Em alguns tipos de transfecção o rendimento pode ser aumentado com a utilização de um DNA carregador, por isso adicionamos esta variável ao teste para verificar se neste caso ocorreria uma melhora.

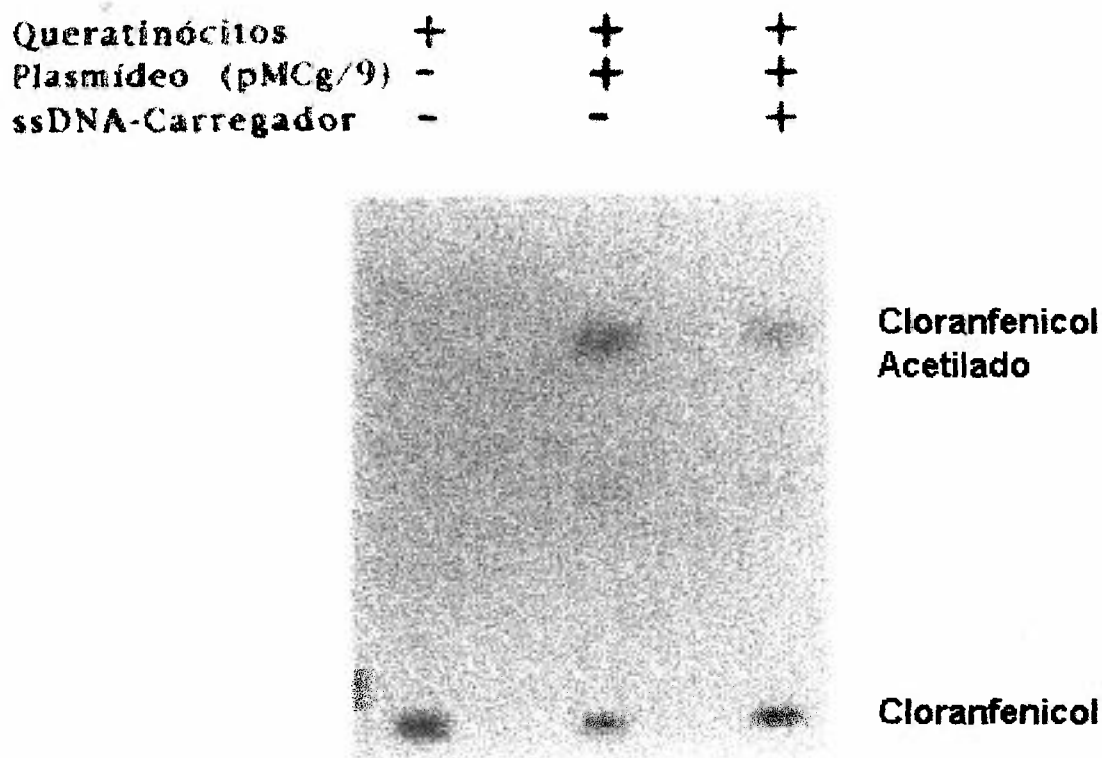


Fig.21. Transfecção feita com Lipofectina em queratinócitos em crescimento exponencial. A lise das células, para o teste de CAT, foi efetuada após 24 horas do final da transfecção. A positividade da reação é verificada pela acetilação do cloranfenicol que na cromatografia migra mais que o cloranfenicol não acetilado.

Pudemos observar que a transfecção transiente é factível mesmo sem a ajuda de DNA-carregador. Este tipo de transfecção, se obtida com um rendimento razoável, teria interesse imediato para o estudo da regulação da expressão proteica, porém não seria viável, posteriormente, para sua utilização em humanos.

5. Padronização do método de infecção retroviral dos queratinócitos, utilizando o gene da β -Galactosidase como marcador

O gene da enzima bacteriana β -Galactosidase (β -gal) é um excelente marcador, pois não é encontrado naturalmente em células humanas; portanto após a reação com o substrato X-gal, podem-se visualizar nitidamente quais as células infectadas, já que estas desenvolvem uma coloração azul de fácil visualização.

5.1. Vetor retroviral LBSN

O gene da β -gal foi inserido sob o controle transcripcional do LTR viral do MoMLV, no vetor retroviral LXS_N (Fig. 22). Os vetores derivados do LXS_N provaram ter um bom desempenho em células humanas, com relação a título, estabilidade de integração e nível de expressão do gene (131).



Fig.22. Estrutura de LBSN construído a partir do vetor retroviral LXS_N

5.2. Células produtoras do gene β -gal (Am12/LBSN)

O vetor retroviral LBSN inserido na linhagem celular anfotrófica de empacotamento GP+envAm12 conforme descrito por Salvatori, G. e col. (131), foi gentilmente doado pelo Dr. Fulvio Mavilio.

5.3. Teste de verificação de eficiência das células produtoras Am12/LBSN, quando utilizadas como "feeder layer"

A intenção deste experimento foi saber se as células Am12/LBSN podem ser utilizadas como camada de sustentação ("feeder layer") para os queratinócitos, permitindo assim a infecção direta destes pelo contato célula-célula.

Foi feita a determinação do crescimento de população celular (**CC**) dos queratinócitos utilizando como parâmetro o número de células da cultura em estudo em comparação com o número de células obtidas em culturas que cresceram em contato com a linhagem celular 3T3-J2, irradiada com 60 Gy (6000 rads) e usada como camada de sustentação.

5.3.1. Crescimento de população celular

5.3.1.1. Variação de concentração celular e intensidade de irradiação

Foi determinada a **CC** variando a quantidade de células Am12/LBSN (25 e 50×10^3 células/cm²) e a intensidade de irradiação 30 e 60 Gy (3000 e 6000 rads) a que elas foram expostas, semeando 5×10^3 queratinócitos/cm² em poços de 9,6 cm² e contando o número de células no momento em que o controle atingiu a confluência (Fig. 23).

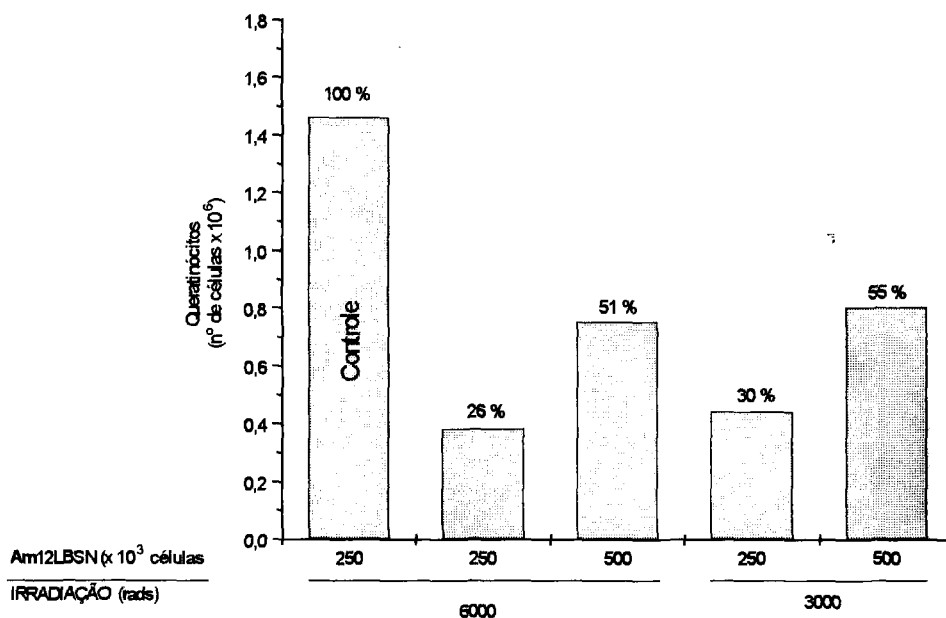


Fig.23. Eficiência de camada de sustentação pelo método de Crescimento de população celular variando o número de células e a irradiação.

Com este experimento pudemos verificar que diminuindo a quantidade de irradiação não aumentamos significativamente o rendimento do crescimento celular, além de correremos o risco de alguma possível duplicação dos fibroblastos. Verificamos também que, mesmo duplicando a quantidade de células Am12/LBSN, alcançamos somente a metade do crescimento celular com relação às células que cresceram sobre uma camada de sustentação, constituída de fibroblastos 3T3-J2. Com a mesma quantidade que a dos fibroblastos 3T3-J2, este rendimento cai para 1/4.

5.3.1.2. Variação de concentração com mistura de linhagens celulares

Uma nova determinação do **CC** foi feita variando a quantidade de células Am12/LBSN, porém adicionando também concentrações variadas de 3T3-J2 (Fig. 24), formando uma camada de sustentação mista.

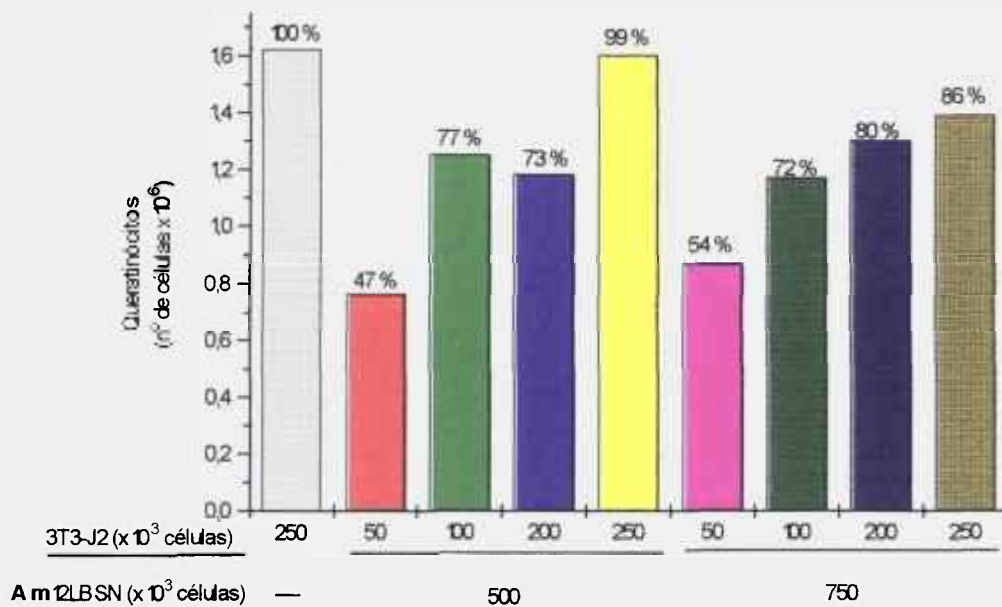


Fig.24. Eficiência da camada de sustentação determinada pelo método de Crescimento de população celular variando a proporção de células Am12/LBSN e 3T3-J2.

Com o resultado do experimento anterior, decidimos preparar uma camada de sustentação mista, variando as proporções de Am12/LBSN e 3T3-J2, obtendo o melhor crescimento dos queratinócitos, quando dobramos a quantidade de Am12/LBSN sem alterar a quantidade de 3T3-J2.

5.3.2. Eficiência de formação de colônias

Em paralelo ao **CC** foi efetuada a determinação de Eficiência de Formação de Colônias (**EFC**) dos queratinócitos, utilizando como parâmetro o número de colônias (abortivas e não abortivas) formadas quando os queratinócitos são semeados em camadas de sustentação mista, variando tanto as células Am12/LBSN como as células 3T3-J2 (Fig. 25). Foi usado como controle o mesmo número de queratinócitos semeados numa camada de sustentação constituída somente de células 3T3-J2.

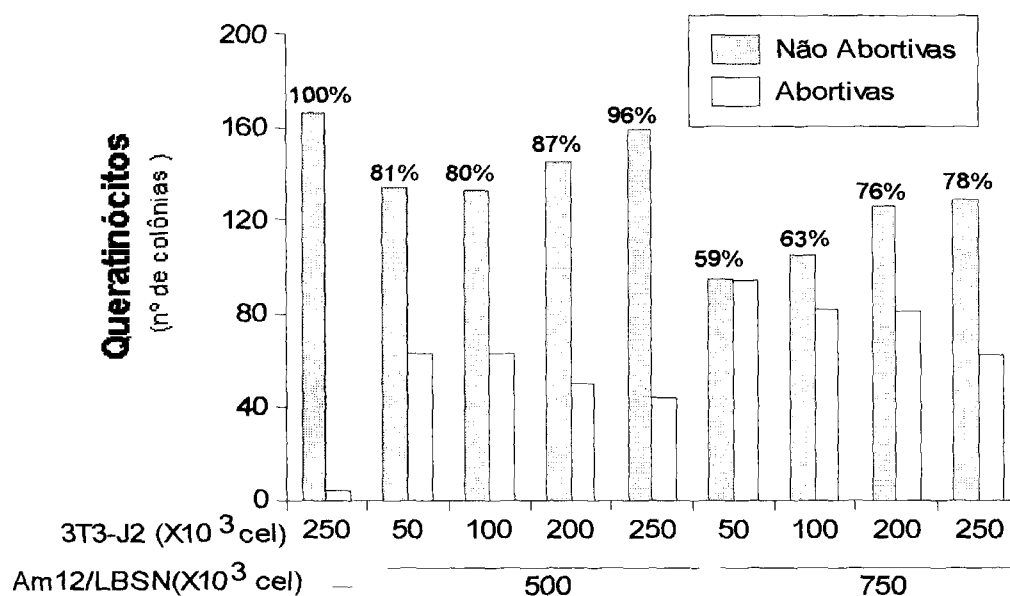


Fig. 25. Eficiência da camada de sustentação determinada pelo método de Eficiência de Formação de Colônias (número de colônias).

Destes experimentos podemos concluir que a irradiação de 30 e 60 Gy (3000 e 6000 rads) não tem uma variação considerável quando utilizamos as células Am12/LBSN como camada de sustentação e que somente estas não são suficientes para auxiliar o crescimento dos queratinócitos. Podemos observar também que a melhor proporção da mistura de células Am12/LBSN e 3T3-J2, é de 2:1 respectivamente.

5.4. Infecção dos queratinócitos com as células Am12/LBSN, utilizando tempo e concentrações variadas de polibreno

A infecção retroviral, normalmente, ocorre na presença de polibreno que age alterando as cargas da membrana celular, tornando-a mais permeável à penetração do gene, porém a longa permanência desta substância em contato com os queratinócitos pode causar danos às células.

O experimento foi efetuado em poços de 9,6 cm² com 50, 100 e 200 x 10³ queratinócitos semeados sobre uma camada de sustentação constituída de Am12/LBSN e 3T3-J2 (2:1) e adição de polibreno nas concentrações de 4 e 8 µg/ml, por 1 ou 2 dias, comparando com a não adição de polibreno e visualizando o resultado ao microscópio e por meio do teste histoquímico com o substrato X-gal. Como controle negativo foram utilizadas as mesmas quantidades de queratinócitos semeados em uma camada de sustentação constituída de fibroblastos 3T3-J2.

Como resultado, foi observado não haver diferença entre a infecção com e sem polibreno (detectado pelo nível de coloração após a reação com o substrato X-gal), sendo que podia-se observar leve alteração do crescimento e morfologia celular nas culturas onde foi adicionado polibreno (resultado não apresentado).

5.5. Determinação do tempo de infecção e quantidades de queratinócitos inicialmente semeados

Para determinar por quantos dias os queratinócitos deveriam permanecer em contato com as células produtoras Am12/LBSN e quantos queratinócitos deveriam ser semeados, foram efetuados os seguintes experimentos:

5.5.1. Contato das células até a semiconfluência dos queratinócitos

Este experimento foi feito semeando 50×10^3 queratinócitos em seis poços de $9,6 \text{ cm}^2$ contendo uma camada de sustentação mista de Am12/LBSN e 3T3-J2 (2:1) irradiados, sendo que após semiconfluência (~7 dias), três destes poços foram utilizados para a reação com o substrato X-gal e os outros três para passar 50×10^3 queratinócitos, agora sobre uma camada de sustentação constituída somente de fibroblastos 3T3-J2 (1ª passagem). Como controle negativo foram semeadas as mesmas quantidades de queratinócitos, porém sobre uma camada de sustentação constituída somente de 3T3-J2 e como controle positivo foram semeados somente Am12/LBSN irradiados, sem a adição de queratinócitos.

Este processo foi repetido para as passagens sucessivas até a quinta passagem, verificando-se que a porcentagem de células infectadas na primeira passagem era menor (em torno de 1%) que nas passagens sucessivas (aproximadamente 10%), apesar dos queratinócitos não estarem mais em contato com as células produtoras.

5.5.2. Duplo contato com as células infectivas

O experimento anterior foi repetido acrescentando uma passagem a mais dos queratinócitos infectados, na camada de sustentação mista. Portanto os queratinócitos ficaram em contato com as células produtoras não só no início, mas também na 1ª passagem, passando aos fibroblastos 3T3-J2 somente após a 2ª passagem, sendo então mantidos, exclusivamente, em contato com estes.

Desta maneira, verificou-se inicialmente uma maior porcentagem de infecção, porém as células demoraram mais tempo para se recuperar nas passagens posteriores, indicando um provável "stress" celular devido ao longo contato com as células produtoras de vírus. Este resultado demonstrou que esta técnica de duplo contato não pode ser utilizada.

5.5.3. Variação da concentração de queratinócitos e de tempo de contato

Foram semeados 5, 15, 50 e 100 x 10³ queratinócitos em cada poço de 1,96 cm² em 5 placas contendo uma camada de sustentação mista de Am12/LBSN e 3T3-J2 (2:1) irradiados. Como controle negativo foram semeadas as mesmas quantidades de queratinócitos, porém sobre uma camada de sustentação constituída somente de 3T3-J2 e como controle positivo foram semeados somente Am12/LBSN irradiados, sem a adição de queratinócitos.

Procedeu-se à fixação das células e a reação histoquímica com o substrato X-gal, na presença de hexaferricianato e hexaferrocianato de potássio, para cada placa, após 3, 5, 7, 10 e 15 dias de infecção. Foram detectadas colônias totalmente infectadas, colônias parcialmente infectadas e colônias não infectadas (Fig. 26).

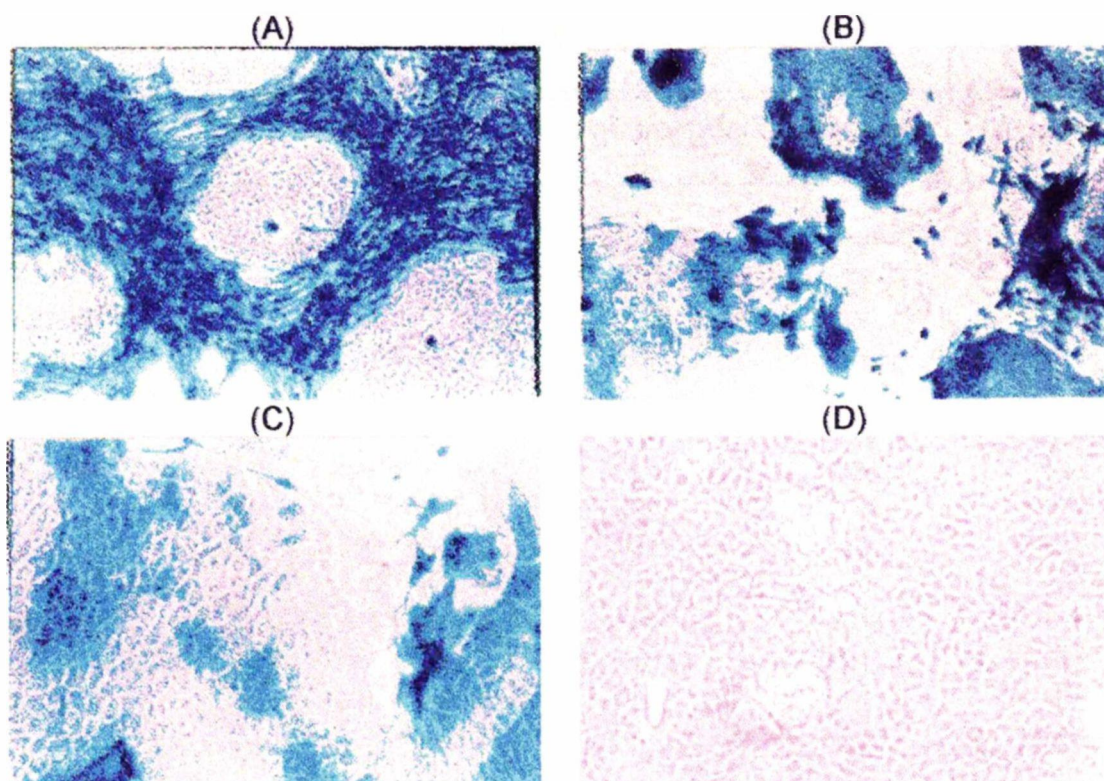


Fig.26. Queratinócitos infectados com o gene da enzima β -Galactosidase. (A) Após infecção de 7 dias; (B) colônias negativas, positivas e parcialmente positivas após infecção de 3 dias; (C) cultura confluyente de queratinócitos infectados por um período de 3 dias e (D) cultura confluyente de queratinócitos não infectados (controle).

Foram efetuados outros 4 experimentos variando o tempo de contato dos queratinócitos com a camada de sustentação mista (3, 4, 5 e 6 dias), sendo que em cada um dos experimentos foram semeadas quantidades variadas de queratinócitos ($25, 50, 100$ e 200×10^3 células/poço de $9,6 \text{ cm}^2$).

Para cada um dos experimentos, após a infecção, foram efetuadas 5 passagens sucessivas em camada de sustentação, constituída somente de células 3T3-J2, sendo efetuados em duplicata para poder realizar o teste histoquímico de verificação da positividade da β -Galactosidase e, simultaneamente, ir para a próxima passagem (Tabela 5).

Tabela 5. Verificação visual da coloração positiva indicativa da expressão da enzima β -galactosidase.

Número de passagens	Infecção (dias)	Número de queratinócitos semeados ($\times 10^3$)			
		25	50	100	200
1	3	-	-	\pm	\pm
1	4	-	-	-	-
1	5	+	+	+	+
1	6	+++	+++	++++	++++
2	3	++	++	++ \pm	++ \pm
2	4	+++	+++	++ \pm	++ \pm
2	5	++	++	++ \pm	++ \pm
2	6	+++	++ \pm	++	++
3	3	+++	+++	+++	+++
3	4	++ \pm	++	++	++
3	5	++ \pm	++ \pm	++	++
3	6	++	++	++	++
4	3	+++	+++	++ \pm	++ \pm
4	4	++ \pm	++ \pm	++	++
4	5	++	++	++	++
4	6	++	++	++	++

-> 0% +> ~ 10% ++> de 20 a 30% +++> de 40 a 50% ++++> > que 60%

Neste experimento foi verificado que apesar dos queratinócitos crescerem bem na camada de sustentação mista, estes não se desenvolvem tão bem nas passagens sucessivas quando permanecem longo tempo em contato com as células produtoras Am12/LBSN. Portanto, concluímos que a quantidade de queratinócitos normalmente semeada, ou seja, 50×10^3 células/ $9,6 \text{ cm}^2$, podem ficar em contato com a camada mista de sustentação por 3 dias.

5.6. Clonagem das células infectadas para confirmação de expressão

Como já mencionado no item **5.5.1.**, observamos que algumas células pareciam negativas à reação com X-gal, quando em condição não favorável, passando a positivas em condições favoráveis. Portanto, decidimos clonar estas células para confirmar esta observação.

Os queratinócitos foram mantidos em contato com a camada de sustentação mista por 3 dias, tripsinizando e diluindo estas células à concentração de 1 célula por poço, para clonagem em 150 poços. Foram considerados somente os poços onde cresceu apenas uma colônia, sendo que metade destas células foram novamente semeadas para passagens sucessivas e na outra metade foi feita coloração. Este procedimento foi repetido até a quarta passagem para todos os poços provenientes de uma única colônia.

Como resultado foram encontrados clones inicialmente negativos que mantiveram negatividade, clones inicialmente positivos que mantiveram a positividade e, o dado mais importante, clones inicialmente negativos que se tornaram positivos (Fig. 27).

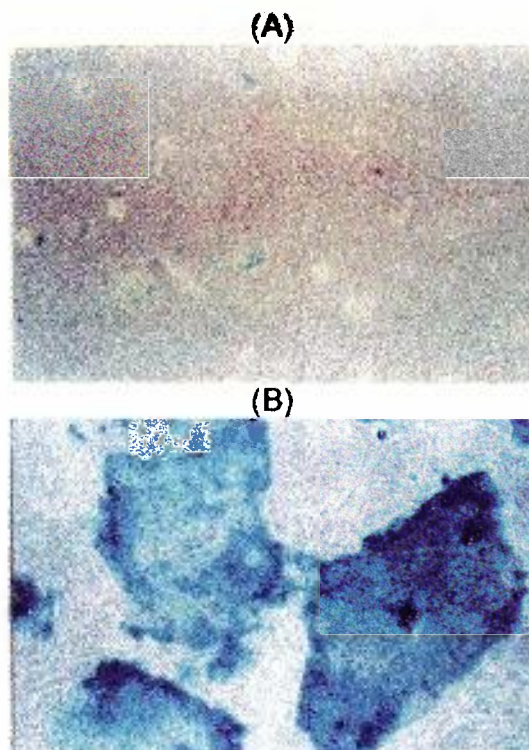


Fig. 27. Clonagem. (A) Células negativas provenientes da primeira passagem de um clone; (B) Terceira passagem do mesmo clone.

Após esta seqüência de experimentos, pudemos concluir que a melhor condição para a infecção de queratinócitos com células produtoras contendo uma construção retroviral do gene de interesse foi:

Semear 5×10^3 queratinócitos por cm^2 em uma camada de sustentação mista de 50×10^3 células produtoras e 25×10^3 células 3T3-J2 por cm^2 . Manter em contato por 3 dias e passar o total dos queratinócitos para uma nova camada de sustentação constituída somente de fibroblastos 3T3-J2.

A Fig. 28 mostra um exemplo da manutenção da infecção de queratinócitos com o gene da enzima β -Galactosidase, efetuada nas condições acima determinadas. A figura mostra a eficiência de formação de colônias após a

quinta passagem de células derivadas de uma infecção com um rendimento inicial de 50%, sendo passados 10 dias destas células em cultura. A reação com o substrato X-gal para verificação da atividade enzimática foi feita após 10 dias de cultura, com posterior coloração com Rodamina-B confirmando uma positividade em, aproximadamente, 50% das colônias.

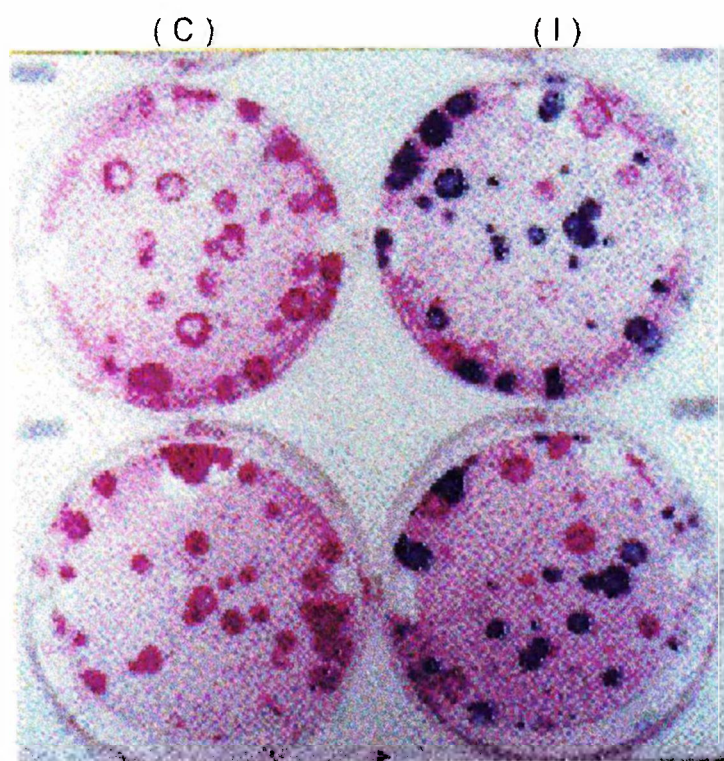


Fig.28. EFC de queratinócitos na quinta passagem após a infecção. Positividade da atividade da enzima β -Galactosidase de queratinócitos infectados (I), em relação ao controle (C), constituído de queratinócitos não infectados.

6. Caracterização "in vivo" do produto da infecção com Am12/LBSN

6.1. Infecção dos queratinócitos

Foram semeados $2,1 \times 10^6$ queratinócitos em uma garrafa de cultura de 175 cm^2 contendo uma camada de sustentação mista constituída de $8,4 \times 10^6$ células Am12/LBSN e $4,2 \times 10^6$ células 3T3-J2 irradiadas. Após 3 dias estas células foram semeadas em outra garrafa de cultura de 175 cm^2 contendo só células 3T3-J2 como camada de sustentação e, chegando à semiconfluência, foram novamente semeadas em duas garrafas de cultura de 75 cm^2 contendo só células 3T3-J2 irradiadas.

6.2. Preparo do enxerto

Após o segundo dia de confluência as células, preparadas como descrito no item anterior, foram destacadas da garrafa de cultura com Dispase e acondicionadas em pequenos pedaços de $\sim 1 \text{ cm}^2$ de gaze vaselinada.

6.3. Implante da epiderme reconstituída "in vitro"

O enxerto desta epiderme foi efetuado em 8 camundongos atímicos, como descrito em material e métodos, tendo sido usados como controle 2 camundongos com enxerto semelhante porém de queratinócitos que não entraram em contato com a camada mista de sustentação.

6.4. Verificação da manutenção do gene infectado

O primeiro enxerto foi retirado após 9 dias do implante e os outros, sucessivamente, com intervalos de 7 dias. Para cada implante retirado de um camundongo, foi efetuado o teste para verificação da presença da β -Galactosidase antes de proceder aos cortes histológicos.

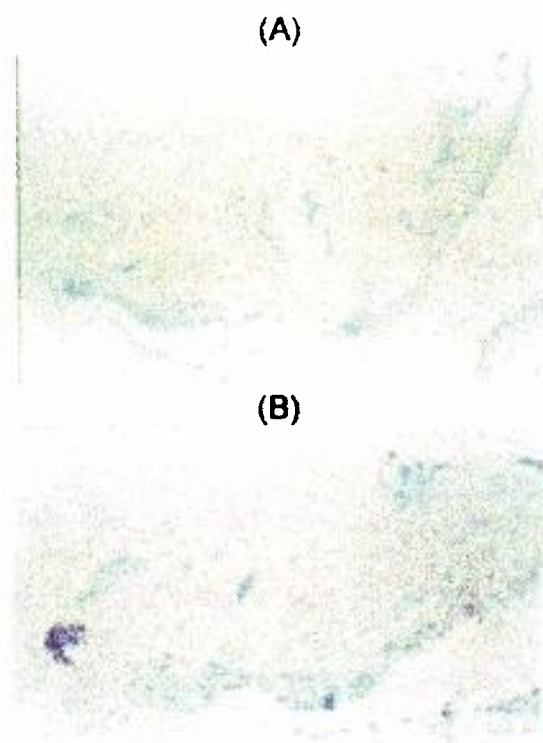


Fig.29. Corte histológico do enxerto. (A) Positividade após 9 dias e (B) Positividade após 16 dias.

Na primeira epiderme estudada somente algumas células diferenciadas foram positivas para a expressão do gene em estudo, porém a partir da segunda houve aumento do número de células basais positivas (Fig. 29), mantendo a positividade até o último camundongo, após 2 meses, apesar do enxerto se apresentar deteriorado.

7. Preparo de vetor retroviral contendo o cDNA de uma proteína circulante (Interleucina-6), sem um promotor regulável.

Após a padronização das condições ideais de infecção retroviral em queratinócitos, utilizando o gene da β -galactosidase, decidimos preparar um novo vetor retroviral contendo o cDNA de uma proteína circulante sob o controle transcripcional do LTR (um promotor forte) do retrovírus, para verificação do seu comportamento "in vitro" (no meio de cultura) e "in vivo" (em camundongos atímicos).

7.1. Vetor retroviral LhIL6SN

a. O cDNA da hIL-6 foi retirado do plasmídeo pHIL-6 utilizando digestão com a enzima Eco RI para cortar uma das extremidades e a enzima Ban I para cortar a outra extremidade, com subsequente tratamento com Klenow, para eliminar as bases protuberantes.

b. O vetor LXS_N foi aberto, no seu sítio de poli-ligação, com as enzimas Eco RI e Hpa I.

c. O cDNA da hIL-6 e o vetor LXS_N foram purificados com a membrana DEAE celulose NA-45, após eletroforese em gel de agarose 1%.

d. Após a purificação foi efetuada a defosforilação do vetor com fosfatase alcalina de intestino bovino (CIP), para diminuir a possibilidade de uma ligação das suas duas extremidades.

e. Foi utilizada a enzima T₄ DNA ligase, por 18 horas a 16 °C, para ligar o fragmento hIL-6 ao vetor LXS_N, obtendo-se a construção retroviral LhIL6SN (Fig. 30).

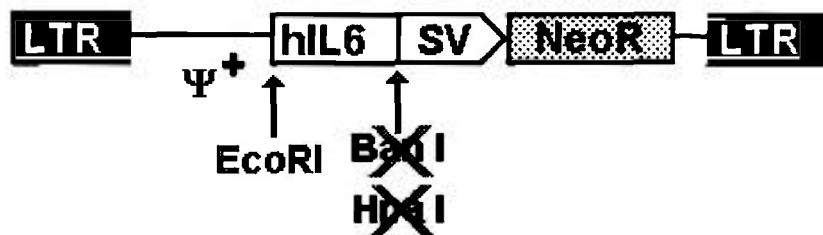


Fig.30. Estrutura de LhIL6SN construído a partir do vetor retroviral LXS_N. Os sítios indicados com (X) foram eliminados durante a construção.

f. A amplificação deste vetor foi feita em bactérias competentes DH-1 por eletroporação. As colônias positivas encontradas, após plaqueamento em LB-agar-ampicilina, foram testadas para confirmar a presença da construção retroviral, sendo aquelas positivas amplificadas em meio de cultura LB e o plasmídeo, purificado em coluna QIAGEN-500, estando desta maneira pronto para utilização.

8. Obtenção das células produtoras do gene da Interleucina-6

8.1. Transfecção transiente em células ecotróficas

A construção viral LhIL6SN foi inserida, primeiramente, na linhagem celular ecotrófica de empacotamento GP+E86 (Fig. 3) pela técnica de co-precipitação do DNA com fosfato de cálcio e o sobrenadante desta cultura foi retirado após 48 horas do término da transfecção para ser utilizado posteriormente (Fig. 31).

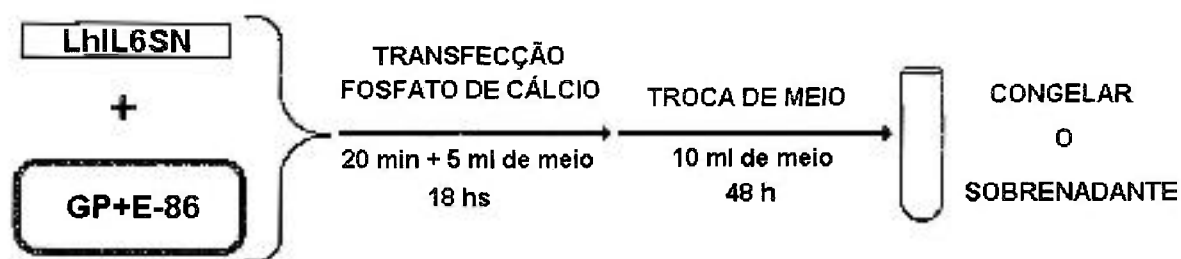


Fig.31. Transfecção transiente em linhagem ecotrófica.

8.2. Infecção permanente em células anfitriãs

O sobrenadante da cultura de células GP+E86 transfectadas foi utilizado para infectar a linhagem celular anfitriã de empacotamento GP+envAm12 (Fig. 32).

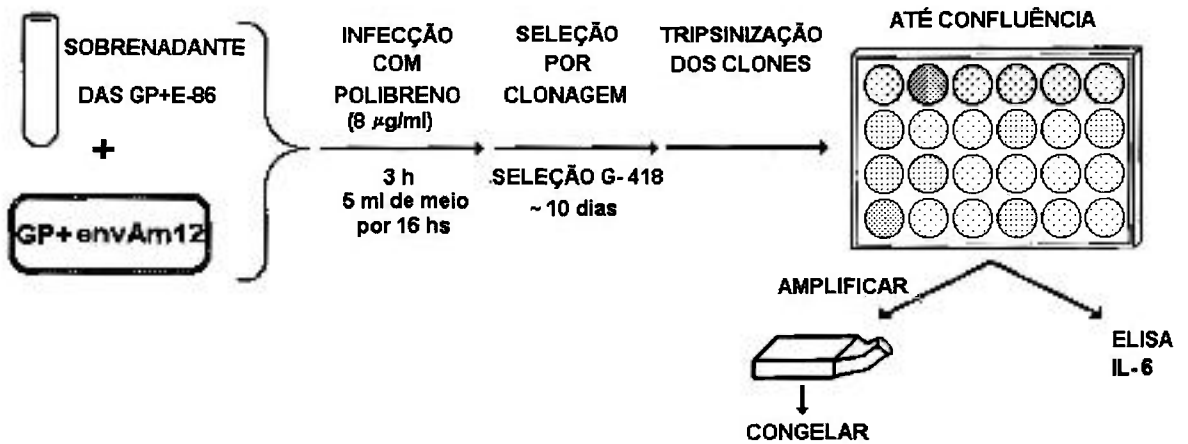


Fig.32. Infecção permanente em linhagem anfotrófica.

- O meio de cultura obtido da transfecção transiente foi adicionado de polibreno 8µg/ml e deixado em contato com as células GP+envAm12 por, aproximadamente, 18 horas.
- Após 24 horas da infecção foi iniciada a seleção com geneticina G-418.
- Após 10 dias de seleção, foram encontrados 37 clones positivos, ou seja, resistentes à neomicina, sendo transferidos para poços de cultura individuais onde cresceram até atingir a confluência. A seguir estas células foram amplificadas em garrafas T25, até se obter uma quantidade suficiente para serem congeladas. Este processo durou em torno de 30 dias.

8.3. Determinação quantitativa de IL- 6

Os sobrenadantes destes clones foram testados para a presença da proteína Interleucina-6 humana, com o kit "Quantikine - Human IL-6 Immunoassay", obtendo-se em 7 deles concentrações abaixo de 15 pg/cm²/dia, os quais foram descartados; 20 clones com concentrações variando de 15 a 250 pg/cm²/dia e 10 clones com concentrações acima de 250 pg/cm²/dia.

8.4. Titulação

A capacidade de infecção do sobrenadante dos clones com produções as mais altas de Interleucina-6 foi testada em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e posterior seleção das células infectadas com G-418.

Os clones escolhidos foram aqueles que forneceram títulos maiores que 10⁴ ufc/ml (unidade de formação de colônia por ml de sobrenadante das células infectadas) e com alta produção da proteína de interesse, sendo que o clone utilizado nos experimentos posteriores foi aquele que mostrou um título de 3 x 10⁵ ufc/ml e concentração de 296 pg de IL-6/cm²/dia.

Com estes procedimentos obtivemos uma linhagem celular produtora do gene de interleucina-6 (**Am12/LhIL6SN**), pronta para infectar os queratinócitos.

9. Infecção dos Queratinócitos com a Construção Viral Am12/LhIL6SN

Após a padronização da infecção dos queratinócitos com um cDNA de uma enzima que se mantém intracelular, o próximo passo foi a infecção com o cDNA de uma proteína que ganha o espaço extra-celular podendo ser detectada no meio de cultura, quando o estudo é feito “in vitro”, ou em circulação, quando o estudo é feito “in vivo”.

9.1. Infecção

A infecção foi efetuada semeando 50×10^3 queratinócitos em 6 poços de $9,6 \text{ cm}^2$ contendo uma camada de sustentação mista de células produtoras Am12/LhIL6SN e fibroblastos 3T3-J2 (2:1) irradiados com 60 Gy (6000 rad). Os queratinócitos foram mantidos em contato por 3 dias, tripsinizados e semeados novamente sobre uma nova camada de sustentação constituída somente de fibroblastos 3T3-J2. Como controle positivo, os queratinócitos foram infectados, nas mesmas condições, com as células produtoras Am12/LBSN. Esta última infecção foi também utilizada como controle negativo da proteína secretada para o meio de cultura. Outro controle utilizado foi a simulação da infecção sem a adição de queratinócitos.

9.2. Comparação entre tempos de vida celular de queratinócitos infectados com diferentes vetores

Foi realizado um estudo comparativo do tempo de vida celular dos queratinócitos infectados com a construção retroviral LhIL6SN, em relação

àqueles infectados com a construção retroviral LBSN. A determinação do tempo de vida de uma cultura celular é feita pelo número de gerações destas células, até o momento em que não é mais possível mantê-las em cultura, ou seja, até o final da cultura. Com este fim foram feitas passagens sucessivas dos queratinócitos infectados, semeando a cada passagem 50×10^3 queratinócitos em poços de $9,6 \text{ cm}^2$ e tripsinizando-os quando estes atingiram a semiconfluência. Em paralelo foram calculadas as EFC em cada passagem (Fig. 33).

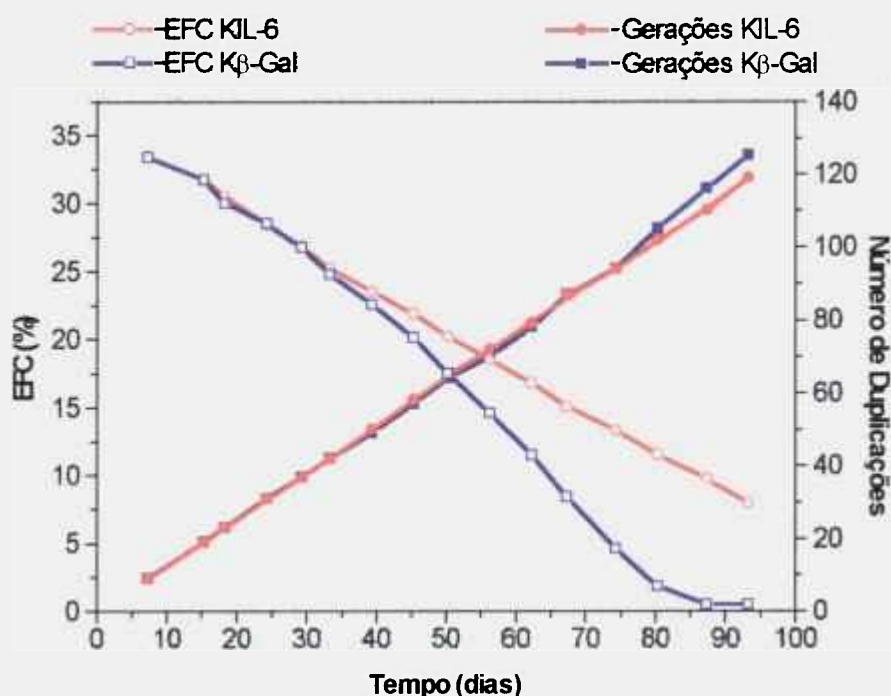


Fig.33. O gráfico mostra o número acumulado de gerações celulares dos queratinócitos infectados com o gene da hIL-6 (KIL-6) (●) e com o gene da β -Galactosidase (K β -Gal) (■), com o concomitante decréscimo da EFC dos mesmos queratinócitos KIL-6 (○) e K β -Gal (□).

Os queratinócitos infectados sobreviveram a 15 passagens, com mais de 120 gerações celulares, durante um período de 95 dias, mostrando, inicialmente, um mesmo comportamento tanto para aqueles que continham o

gene da hLI-6 quanto para os que continham o gene da β -galactosidase. Porém a partir da sétima passagem os queratinócitos que produziam a enzima bacteriana começaram a apresentar uma diminuição mais acentuada da EFC, sendo que próximo ao final da sua vida celular houve uma aceleração do número de duplicações celulares , com relação aos queratinócitos infectados com o gene humano.

9.3. Confirmação da infecção permanente

Paralelamente à determinação do tempo de vida celular, foram efetuadas as dosagens quantitativas das concentrações de Interleucina-6 humana nos sobrenadantes das culturas celulares dos queratinócitos infectados (Fig. 34).

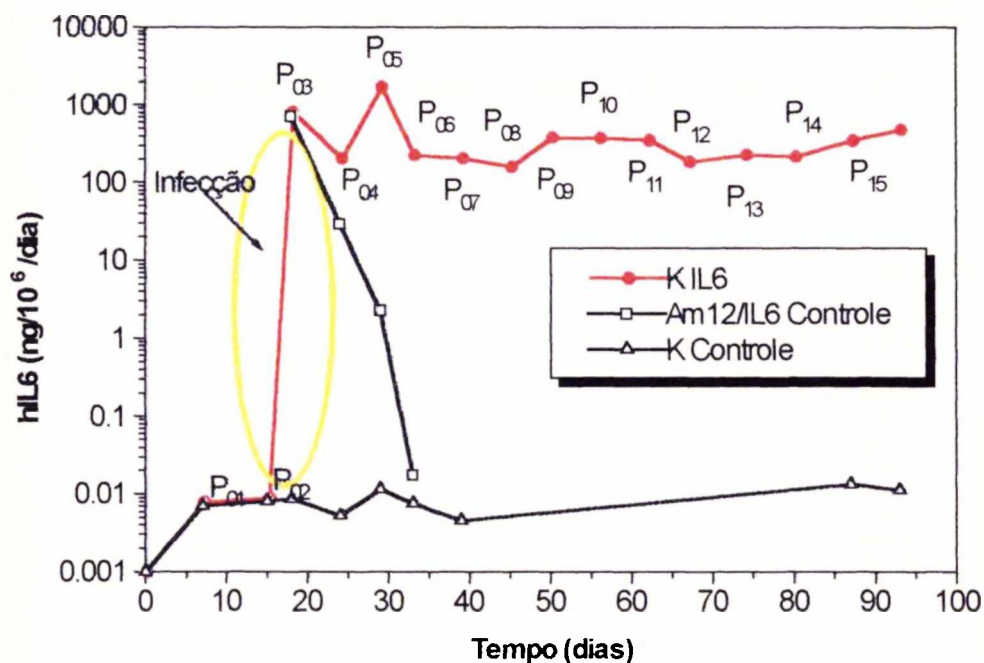


Fig. 34. Concentrações de hIL-6 nos meios de cultura dos queratinócitos infectados (●), dos queratinócitos não infectados (Δ) e da simulação de infecção (□). As letras P₀₁ a P₁₅ indicam as passagens realizadas durante o tempo de vida celular. A região evidenciada em amarelo, corresponde ao período de infecção.

As dosagens de hIL-6 demonstraram a manutenção destas concentrações, em média 500 ng por 10⁶ células por dia, durante todo o tempo de vida celular, comprovando o caráter permanente da infecção. Os dados obtidos

com a simulação da infecção demonstraram que estes valores não sofrem interferência significativa a partir da segunda passagem após a infecção.

9.4. Determinação “in vivo”

Foram preparados enxertos dos queratinócitos a partir da terceira passagem após a infecção com a construção LhIL6SN. O controle foi feito com enxertos de queratinócitos infectados com a construção LBSN. Estes enxertos foram implantados em camundongos atímicos, sendo feitas coletas de sangue por punção cardíaca, em tempos variados até 67 dias (Fig. 35).

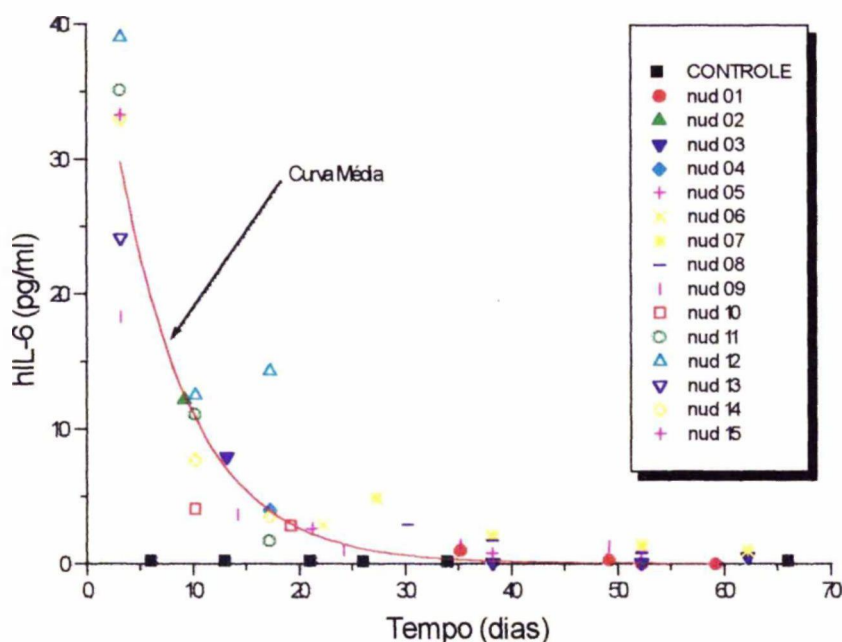


Fig.35. Dosagens da concentração de hIL-6 no sangue de 15 camundongos enxertados com epitélio reconstituído “in vitro”, a partir de queratinócitos infectados com o cDNA desta proteína. Os símbolos (■) indicam os valores de hIL-6 obtidos nos camundongos controle.

Os enxertos correspondentes a cada camundongo foram retirados após a última coleta em tempos que variaram de 3 a 67 dias. Estas biópsias

foram imersas em formol tamponado por 24 horas, transferidas para etanol 90% e enviadas ao Departamento de Anatomia para o preparo dos cortes histológicos e posterior coloração para verificação da integridade da epiderme humana. Foi estudada a correlação entre os níveis de interleucina-6 circulante e a aparência histológica dos enxertos dos camundongos correspondentes (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação da aparência histológica versus a concentração de hIL-6 no sangue do mesmo camundongo no dia da coleta do enxerto.

Número de Camundongos	hIL-6 (pg/ml)	Aparência histológica
4	0 - 0.5	-
4	0.8 - 3.5	++
5	4.0 - 33.3	+++

- epiderme humana não visível

++ enxerto com aparência razoável e média aderência ao derma do camundongo

+++ enxerto com boa aparência e boa aderência ao derma do camundongo

A figura 36 mostra um exemplo de cortes histológicos de uma epiderme humana reconstituída "in vitro" a partir de queratinócitos infectados com o gene da Interleucina-6, implantada em contato direto com a derme do camundongo. Este exemplo mostra as classificações ++ e +++ do item **aparência histológica** da Tabela 6.

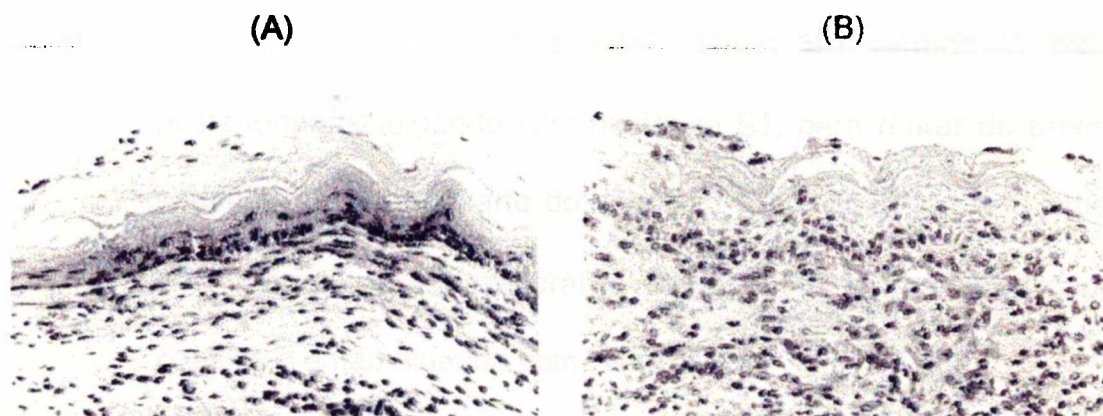


Fig.36. Corte histológico da interação epiderme humana - derme camundongo (aumento de 375 vezes). (A) corte com aparência razoável e (B) corte com boa aparência.

10. Preparo da construção retroviral do cDNA do hormônio de crescimento humano, sob controle do promotor regulável da metalotioneína

10.1. Construção retroviral DChPMTGH

- a. Com a experiência adquirida com a construção de um vetor mais simples (LhIL6SN), partimos para a construção do nosso vetor de interesse contendo o gene do hormônio de crescimento humano, além de um promotor regulável (Fig. 37).
- b. O cDNA do hGH foi retirado do plasmídeo pHGH6A por digestão com as enzimas Eco RI e Sma I sendo que esta última digere o DNA antes do sinal de poliadenilação (AATAAA), obtendo-se um fragmento de 700 pb.
- c. O fragmento de 700 pb digerido e purificação com membrana NA-45, foi inserido no plasmídeo Bluescript M13 KS+ (linearizado com as enzimas Eco RI e Sma I) utilizando a enzima T4 DNA ligase.
- d. O plasmídeo pHMT-IIA foi linearizado com a enzima Nco I e posteriormente digerido com nuclease S1, para retirar do promotor o codon ATG que faz parte do sítio Nco I; a reação foi complementada com Klenow para assegurar a formação de uma extremidade não coesiva e então digerido com Hind III.

- e.** Este fragmento de 860 pb foi purificado em membrana NA-45 e inserido, por meio da T4 DNA ligase, no plasmídeo obtido em **b.** e digerido com Eco RI e Klenow em uma extremidade e com Hind III na outra.
- f.** O plasmídeo obtido em **d.** foi digerido com as enzimas Apa I e Bam H1 obtendo-se o fragmento de ~1600 pb que foi purificado com membrana NA-45.
- g.** O vetor retroviral utilizado para esta construção foi o N2A que fornece um DNA de dupla cópia na célula alvo (Fig. 5). Este vetor foi digerido, no seu sítio de poli-ligação, com as enzimas Apa I e Bgl II, sendo que esta última fornece um sítio complementar àquele fornecido pela enzima Bam HI.
- h.** O fragmento obtido em **e.** foi inserido no vetor obtido em **f.**, após purificação em membrana NA-45 e defosforilação deste último.

Com os procedimentos acima descritos obtivemos a construção retroviral **DChPMTGH** (Fig. 37) para ser utilizada em transfecção ou preparo de células produtoras para infecção.

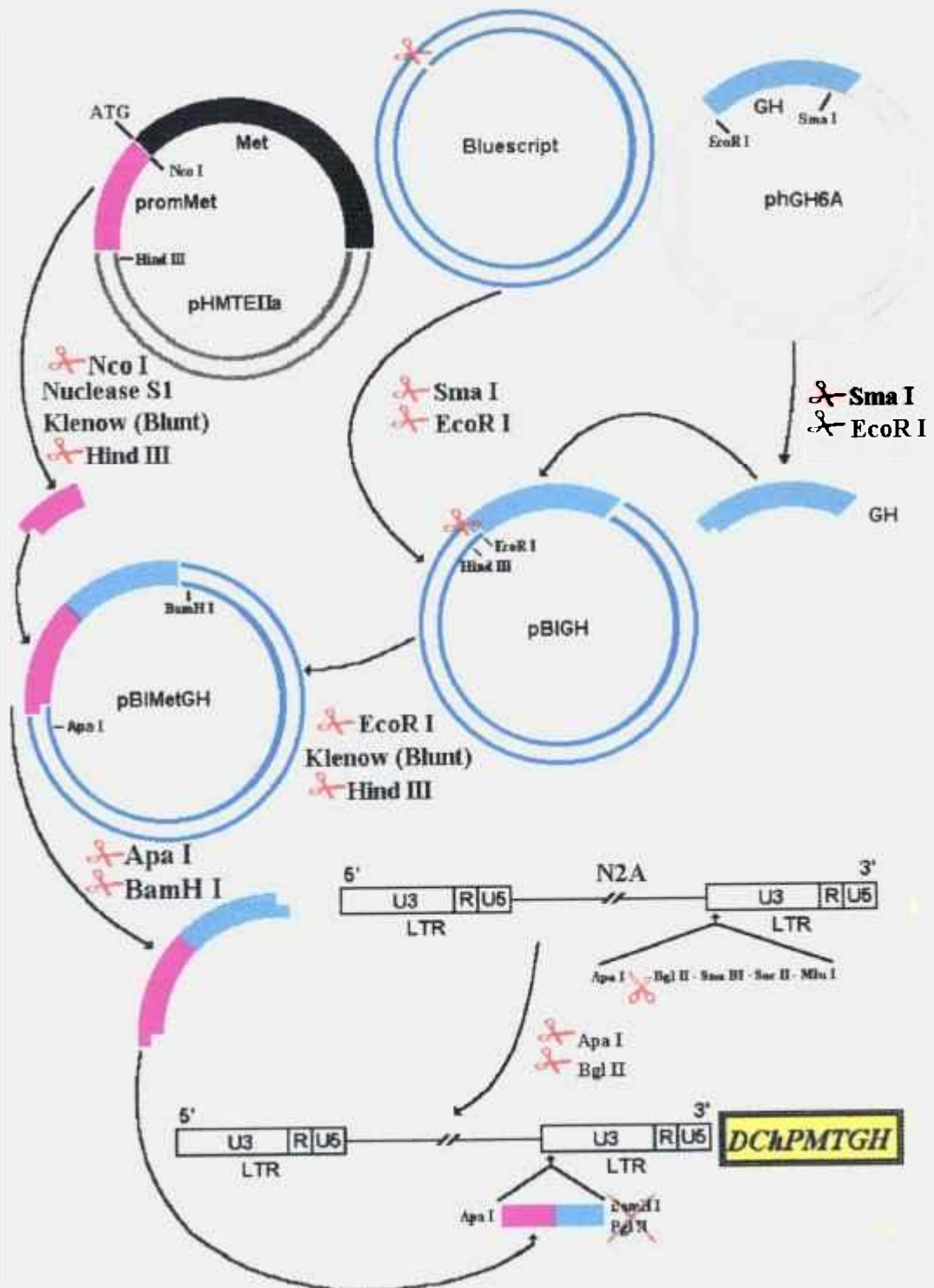


Fig.37. Esquema da construção retroviral DChPMTGH

10.2. Seqüenciamento

Após a construção final do vetor, foi efetuado o seqüenciamento da porção que compreende o final do promotor da metalotioneína e o início do DNA do GH, pois poderia haver uma falha devido à digestão com a nuclease S1, já que esta não pode ser devidamente controlada (Fig. 38).

promotor metalotioneína:

```
5'750pb ~ CCGCGCTGCA CTCCACCACG CCTCCTCCAA GTCCCAGCGA
          ACCCGCGTGC AACCTGTCC C GACTCTAGCC GCCTCTTCAG
          CTCGCC ATG 3'
```

início do cDNA do hGH:

```
5' AATTC CCCCGAACCA CTCAGGGTCC TGTGGACGCT CACCTAGCTG
   CA ATG 650pb ~ ~3'
```

seqüenciamento esperado (promMT - hGH):

```
5'750pb ~ CCGCGCTGCA CTCCACCACG CCTCCTCCAA GTCCCAGCGA
          ACCCGCGTGC AACCTGTCC C GACTCTAGCC GCCTCTTCAG
          CTCGCC AATTC CCCCGAACCA CTCAGGGTCC TGTGGACGCT
          CACCTAGCTG CA ATG 650pb ~ ~3'
```

seqüenciamento obtido (promMT - hGH):

```
5'750pb ~ CCGCGCTGCA CTCCACCACG CCTCCTCCAA GTCCCAGCGA
          ACCCGCGTGC AACCTGTCC AATTC CCCCGAACCA CTCAGGGTCC
          TGTGGACGCT CACCTAGCT CA ATG 650pb ~ ~3'
```

Fig.38. Comparação da seqüência de bases obtidas versus a seqüência esperada pela união do promotor da metalotioneína com o início da transcrição do cDNA do hormônio de crescimento humano.

O resultado do seqüenciamento demonstrou uma perda de 27 bases, devido à ação da nuclease S1.

11. Transfecção dos Queratinócitos com a Construção Retroviral DChPMTGH

Com a construção pronta, decidimos efetuar, primeiramente, uma transfecção direta pelo método do polibreno, com o auxílio de DMSO, mesmo que com baixa eficiência e provavelmente transiente. Este experimento nos permitiria testar se a produção proteica poderia ser ou não regulável pela adição de Zinco.

11.1. Transfecção

Foram semeados 5×10^4 queratinócitos sobre uma camada de sustentação de $2,5 \times 10^5$ fibroblastos 3T3-J2 em poços de $9,6 \text{ cm}^2$ com troca de meio a cada dois dias até a semiconfluência. Quando os queratinócitos atingiram a semiconfluência foram transfectados com a construção **DChPMTGH** com o auxílio de Polibreno e DMSO, segundo técnica descrita no item **13.3.** de **Materiais e Métodos.**

11.2. Ativação

Completada a transfecção, iniciou-se a ativação com ZnCl_2 $100 \mu\text{M}$ por 10 horas, analisando as seguintes condições:

- Células transfectadas não ativadas (KGH),
- Células transfectadas ativadas logo após o final da transfecção (KGH + Zn),
- Células transfectadas e ativadas 12 horas após o final da transfecção (KGH + Zn 12 horas),
- Células transfectadas e ativadas 24 horas após o final da transfecção (KGH + Zn 24 horas),

- Células transfectadas e ativadas 48 horas após o final da transfecção (KGH + Zn 48 horas),
- Células não transfectadas (CONTROLE)

A troca do meio foi feita a cada 24 horas com posterior dosagem do hGH neste meio, utilizando-se um método de fluoroimunoensaio (DELFLIA), altamente sensível (Fig. 39).

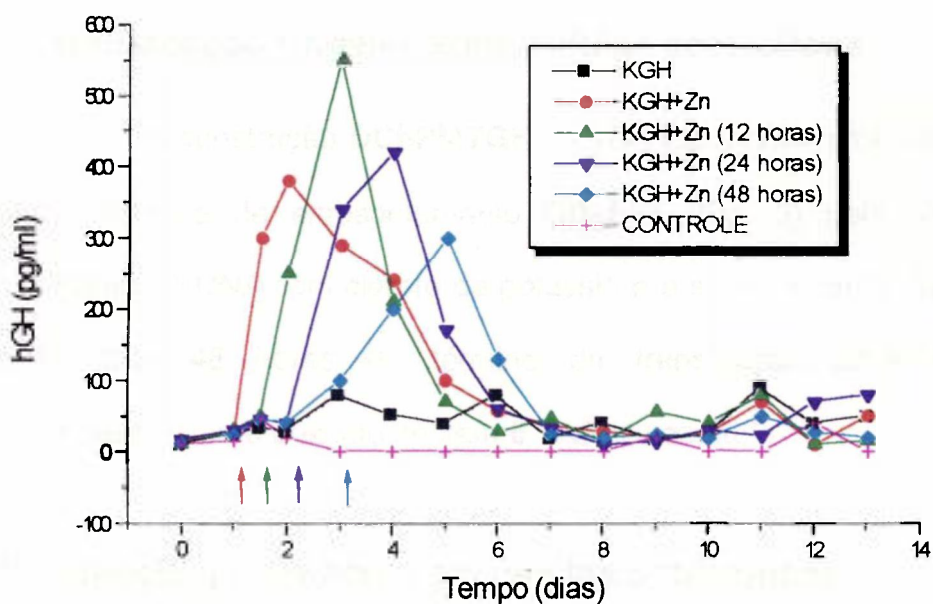


Fig.39. Dosagem de hGH no meio de cultura dos queratinócitos transfectados com a construção retroviral DChPMTGH e ativados com Zinco. As setas indicam cada início de ativação.

O resultado deste experimento nos mostrou que a construção retroviral **DChPMTGH** funciona e que a produção do hormônio de crescimento pode ser aumentada de, aproximadamente, 10 vezes pela ativação com Zinco.

12. Obtenção das Células Produtoras do Vetor Retroviral Contendo o Gene do Hormônio de Crescimento Humano Ligado ao Promotor de Metalotioneína

Após a confirmação da viabilidade da construção retroviral **DChPMTGH**, o próximo passo foi a construção das células produtoras para sua utilização na infecção dos queratinócitos.

12.1. Transfecção transiente em células ecotróficas

A construção **DChPMTGH** foi inserida, primeiramente, na linhagem celular ecotrófica de empacotamento GP+E86 (Fig. 3) pela técnica de co-precipitação do DNA com cloreto de potássio e o sobrenadante desta cultura foi retirado após 48 horas do término da transfecção para ser utilizado, posteriormente, como descrito no item **8.1.** deste capítulo.

12.2. Infecção permanente em células anfotróficas

O sobrenadante da cultura de células GP+E86 transfectadas foi utilizado para infectar a linhagem celular anfotrófica de empacotamento GP+envAm12 (Fig. 3).

A seqüência de infecção foi a mesma daquela utilizada para o preparo das células Am12/LhIL6SN, como descrito no item **8.2.** deste capítulo.

12.3. Determinação quantitativa

Os sobrenadantes dos clones foram testados para a presença do hormônio de crescimento, utilizando-se o método do fluoroimunoensaio (DELFA). Dos 40 clones obtidos com a seleção com geneticina, 14 apresentaram concentrações maiores que 2 ng/cm²/dia, sendo que 8 destes apresentaram concentrações acima de 10 ng/cm²/dia.

12.4. Titulação

A capacidade de infecção do sobrenadante dos 14 clones com as mais altas produções de hormônio de crescimento foi testada em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e posterior seleção das células infectadas com G-418.

Os clones escolhidos foram aqueles que forneceram títulos maiores que 10⁴ ufc/ml (unidade de formação de colônia por ml de sobrenadante das células infectadas) e com alta produção da proteína de interesse, sendo que o clone utilizado nos experimentos posteriores foi aquele que mostrou um título de 3 x 10⁵ ufc/ml e uma concentração maior que 50 ng/cm²/dia.

Com estes procedimentos obtivemos uma linhagem celular produtora do gene de hormônio de crescimento regulável (**Am12/DChPMTGH**) pronta para infectar os queratinócitos.

13. Infecção dos Queratinócitos com a Construção Viral Am12/DChPMTGH

Com esta construção pronta e a padronização da infecção dos queratinócitos já realizada, estávamos aptos a conseguir queratinócitos infectados com rendimento suficiente para serem utilizados sem a necessidade de seleção prévia e com a possibilidade de ativação por metais.

13.1. Infecção

A infecção foi efetuada semeando $3,5 \times 10^5$ queratinócitos em uma garrafa de 75 cm^2 , contendo uma camada de sustentação mista de células produtoras Am12/LhIL6SN e fibroblastos 3T3-J2 (2:1) irradiados com 60 Gy (6000 rad), mantidos em contato por 3 dias, tripsinizados e semeados, novamente, sobre uma nova camada de sustentação, constituída somente de fibroblastos 3T3-J2. Como controle negativo foi utilizado o mesmo procedimento com os queratinócitos semeados sobre uma camada de sustentação constituída somente de fibroblastos 3T3-J2.

13.2. Determinação qualitativa

A determinação qualitativa da produção do hormônio de crescimento humano pelos queratinócitos infectados foi efetuada no meio de cultura destas células, com a técnica de "Western blotting", descrita **em Materiais e Métodos** item 15.6., utilizando como controle positivo o hGH pituitário e como controle negativo o meio de cultura de queratinócitos não infectados (Fig. 40).

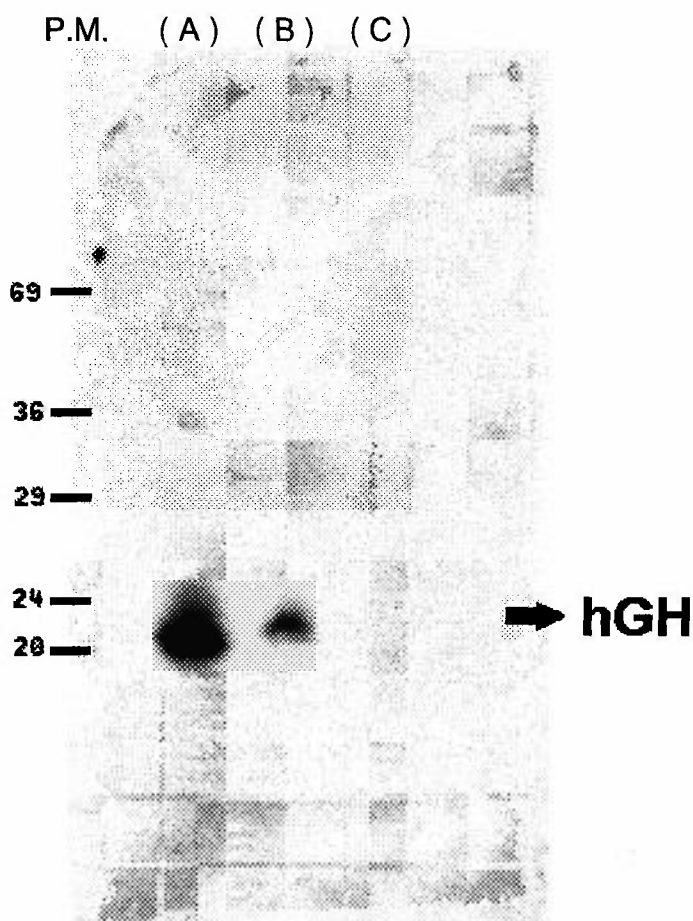


Fig.40. "Western blotting" relativo ao hGH recombinante secretado por queratinócitos humanos normais infectados. (A) hGH pituitário; (B) meio de cultura de queratinócitos infectados e (C) meio de cultura de queratinócitos não infectados.

A autorradiografia nos mostra a produção do hGH recombinante pelas células infectadas com a construção DChPMTGH, sem a formação de dímeros ou aglomerados, enquanto no controle obtido dos queratinócitos não infectados, não pudemos detectar nenhuma reação imunológica com o anticorpo anti-hGH.

13.3. Determinação quantitativa

A determinação quantitativa da produção do hormônio de crescimento humano pelos queratinócitos infectados foi efetuada no meio de cultura destas células, com a técnica de radioimunoensaio (RIE), obtendo-se uma concentração média de 340 ng/10⁶ células/dia.

13.4. Ativação

Após a terceira passagem dos queratinócitos infectados, foram iniciados experimentos de ativação com ZnCl₂ 100 µM, comparando tanto várias ativações de 10 horas cada, quanto estas em relação à ativação permanente. Para a determinação dos resultados, os meios foram trocados a cada 24 horas e dosado o hGH, utilizando o método de radioimunoensaio (RIE).

13.4.1. Ativação durante 10 horas

Os queratinócitos infectados, após o terceiro dia de confluência, foram ativados com ZnCl₂ 100 µM por 10 horas (Fig. 41), analisando as seguintes condições:

- Células transduzidas não ativadas,
- Células transduzidas ativadas uma única vez,
- Células transduzidas ativadas diariamente,
- Células transduzidas ativadas a cada 2 dias,
- Células transduzidas ativadas a cada 3 dias.

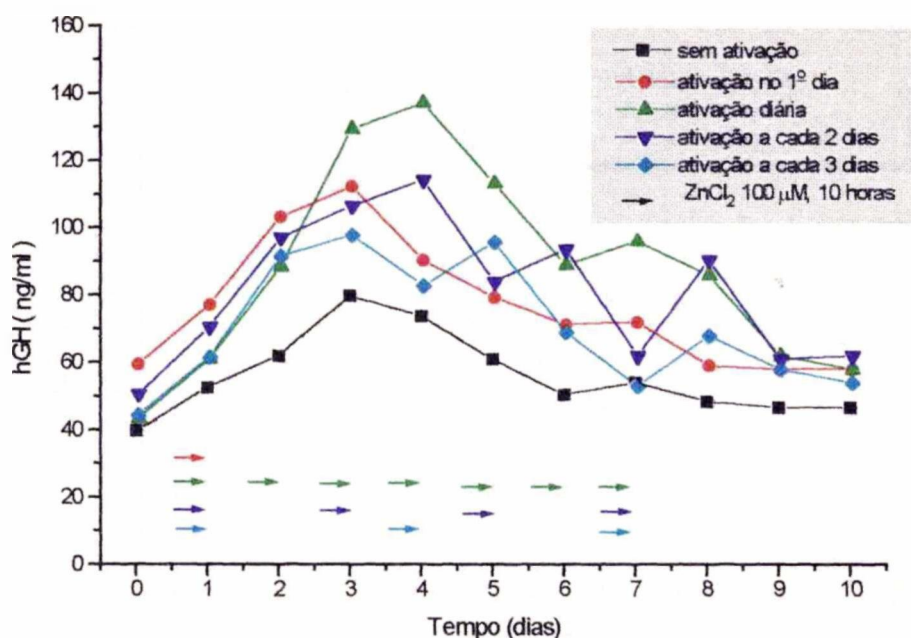


Fig. 41. Dosagem de hGH no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos e ativados com ZnCl₂ 100 µM por 10 horas. As setas indicam os períodos de ativação.

Podemos concluir, por este experimento, que os queratinócitos transduzidos produzem até 2 vezes mais hGH, quando ativados com ZnCl₂ 100 µM por 10 horas, sendo que as mais altas concentrações foram obtidas nos meios de cultura dos queratinócitos ativados diariamente.

13.4.2. Comparação entre ativação diária durante 10 horas e ativação permanente

Além das ativações acima citadas, mantivemos uma cultura de queratinócitos transduzidos em contato permanente com ZnCl₂ 100 µM, trocando o meio de cultura a cada 24 horas por novo meio contendo a mesma concentração de zinco (Fig. 42).

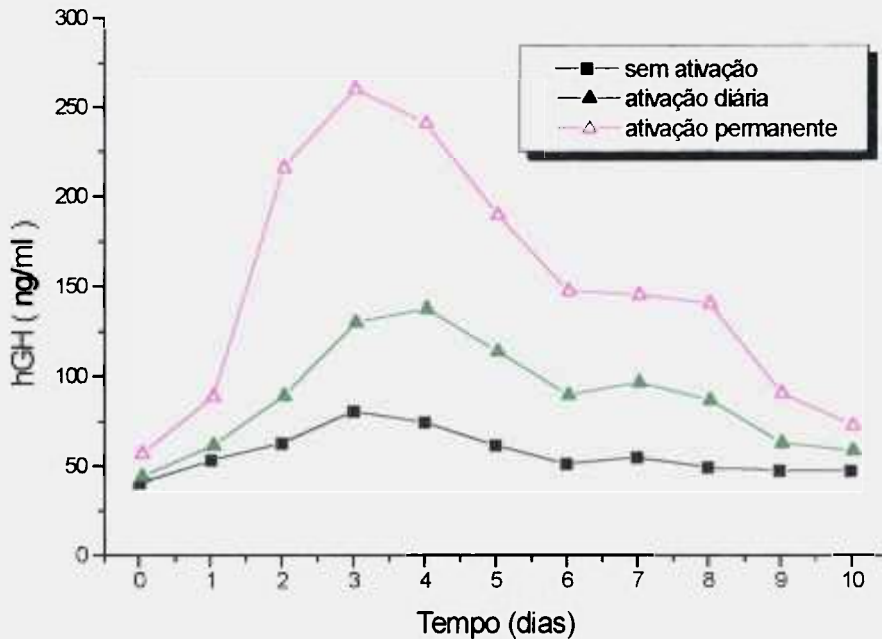


Fig. 42. Dosagem de hGH no meio de cultura dos queratinócitos transduzidos (■) sem ativação; (▲) ativados diariamente com ZnCl_2 100 μM por 10 horas e (△) ativados permanentemente com ZnCl_2 100 μM .

Segundo este experimento, podemos obter concentrações de hGH até 4 vezes mais altas (com relação aos queratinócitos não ativados), ativando permanentemente os queratinócitos transduzidos, sendo que as maiores concentrações foram obtidas após o terceiro dia de ativação.

DISCUSSÃO

Inicialmente tivemos que decidir qual seria o tipo celular a ser utilizado para a expressão do hGH, pois a escolha das células alvo é o primeiro passo crítico em terapia gênica (104). Os queratinócitos ainda não estão sendo utilizados nas provas clínicas de terapia gênica, porém têm um alto potencial como células alvo para o tratamento, por este meio, de doenças da pele causadas por um defeito genético, assim como de doenças sistêmicas (150). Comparados com outras células alvo para a terapia gênica os queratinócitos tem ótimas características, tais como poderem ser obtidos e expandidos, facilmente, a partir de uma pequena biópsia de pele, usando técnicas e condições de cultura bem definidas (122). Como a pele é facilmente visível, se torna simples a verificação das condições do enxerto ao longo do tempo, podendo ser feita, por exemplo, uma pequena biópsia para determinação da presença ou não do gene introduzido.

O fácil acesso ao enxerto faz com que seja factível modular a expressão do gene inserido e dependendo da região regulatória (promotor) do gene introduzido, a expressão pode ser aumentada ou diminuída; existe, ainda, a possibilidade da remoção dos queratinócitos modificados caso não haja mais a necessidade da expressão da proteína desejada. Outra vantagem dos queratinócitos é que eles são capazes de expressar e secretar fatores para distribuição sistêmica pois são potentes produtores de várias citocinas e fatores de crescimento(150).

Para a terapia gênica é importante uma expressão permanente e contínua do produto gênico, e se conseguirmos introduzir o transgene (vetor que carrega o gene desejado) em células basais precursoras ou nas células mãe, evitaremos uma rápida perda deste durante a descamação da pele, pois as células mãe mantêm uma capacidade ilimitada de se autorregenerar e dar origem a queratinócitos proliferantes que eventualmente diferenciam (150).

Em terapia gênica freqüentemente são utilizados promotores virais, pois são ativos em diferentes tipos celulares (98), característica importante que é crítica para a obtenção de altos níveis de expressão do transgene por um longo período de tempo, porém quando utilizados “in vivo”, estes podem ser inativados ou regulados, negativamente, com o passar do tempo diminuindo a expressão do transgene (104). Para assegurar uma expressão do transgene nos queratinócitos enxertados por um longo período, uma alternativa seria a utilização de promotores endógenos ou celulares no lugar de promotores virais, aumentando as possibilidades destes promotores serem ativos (150). No nosso caso, além da expressão, teríamos a necessidade de uma regulação da produção hormonal.

A escolha da utilização do promotor da metalotioneína se prende ao fato deste pertencer a um gene residente (“housekeeping”) que é expresso em uma grande variedade de células e é regulado por vários estímulos ambientais (116).

A fusão do gene do hormônio de crescimento humano com a metalotioneína já foi utilizada com sucesso em camundongos transgênicos, com concentrações no sangue circulante variando de indetectável a 64 $\mu\text{g/ml}$, sendo que após ativação com 25 mM de ZnSO_4 , na água, estes valores aumentaram de 3 a 170 vezes (116). O grande problema foi, exatamente, esta variação de um animal para outro de modo descontrolado, de maneira que os níveis extremamente altos podem causar efeitos colaterais indesejáveis, tais como carcinomas hepatocelulares (114), infertilidade, redução da prolactina e gigantismo (140), diminuição do tempo de vida (119), etc..

Os níveis basais do gene ligado ao promotor da metalotioneína, em geral, são altos antes da indução e aumentam de 5 a 10 vezes quando induzidos (55). Pavlakis e colaboradores conseguiram de 0,2 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de hGH em clones de células de camundongo (linhagem celular C127) transfectadas com a fusão do gene de hGH com o promotor (MTI) da metalotioneína de camundongo em vetor de papiloma vírus bovino (BPV) e posterior clonagem. A indução com CdCl_2 1 μM elevou estes resultados de 1,3 a 2,5 vezes (118).

Com base nos dados já mencionados, optamos por utilizar o promotor regulável da metalotioneína para controlar a expressão do hormônio de crescimento; para tanto deveríamos saber se existe um mecanismo ativo, deste promotor, nas nossas células alvo (queratinócitos). Após nossos experimentos nesse sentido, concluímos que a ativação da metalotioneína nos queratinócitos pode ser observada com maior intensidade se utilizarmos ZnCl_2 100 μM , por um

período de 8 a 12 horas, sem causar dano celular. Pudemos observar, também, que a quantidade de metalotioneína basal, assim como a sua intensidade de ativação, varia de doador para doador, sendo independente do sexo e da idade.

Com base nestes resultados chegamos à conclusão que poderíamos construir o nosso vetor contendo o cDNA do hGH sob a regulação do promotor da metalotioneína e que, teoricamente, após a sua introdução nos queratinócitos humanos normais, estes pudessem produzir o hGH com a capacidade de modulação da sua expressão. Para cumprir este objetivo deveríamos conseguir o maior número possível de queratinócitos que contivessem o transgene. Nosso primeiro passo nesse sentido deveria ser a transfecção direta do transgene nos queratinócitos, porém os queratinócitos após serem transfectados deveriam ser selecionados de maneira a obter uma população de células que contivesse o transgene. Portanto, deveríamos passar por duas fases intermediárias, ou seja, determinar qual a concentração do antibiótico a ser utilizada e preparar fibroblastos resistentes a esse antibiótico para serem utilizados como camada de sustentação.

Para a primeira fase escolhemos dois dos antibióticos mais utilizados para seleção, a geneticina e a higromicina. Com os experimentos efetuados concluímos que as concentrações a serem utilizadas para a seleção dos queratinócitos transfectados, resistentes ao antibiótico, seriam de 500 $\mu\text{g/ml}$ para a geneticina e 50 $\mu\text{g/ml}$ para a higromicina. Estas concentrações foram

determinadas pelo parâmetro de “morte celular” e definidas como sendo a concentração mínima que mata os queratinócitos não resistentes em dois dias.

Quanto à segunda fase, transfectamos, por eletroporação, fibroblastos 3T3-J2 com o plasmídeo pRSV5neo que confere resistência à neomicina. As células obtidas de um dos clones demonstraram ter a mesma eficiência que as células que lhe deram origem (3T3-J2) para serem usadas como camada de sustentação para os queratinócitos, este clone deu origem a linhagem celular 3T3-J2RB. Outra linhagem que poderia ser utilizada como camada de sustentação durante o processo de seleção, seria a NIH-3T3 resistente a geneticina, desde que com o dobro de células normalmente usadas com a linhagem celular 3T3-J2.

Passamos então às tentativas de transfecção, sendo efetuadas transfecções e co-transfecções dos plasmídeos pHMTIIA e pRSV5neo em queratinócitos, utilizando tanto o método da lipofectina como o método do polibreno, selecionando, posteriormente, com G-418. Chegamos à conclusão que a transfecção permanente de plasmídeos nos queratinócitos é difícil e, quando possível, de rendimento muito baixo. Este fato é confirmado, mesmo se utilizarmos plasmídeos extremamente puros. De fato, há dados na literatura que confirmam esta dificuldade de transfecção em queratinócitos humanos primários (144).

Para confirmar se a falta de transfecção não foi devido aos métodos utilizados realizamos uma transfecção transiente utilizando como marcador o

plasmídeo contendo o DNA do gene CAT e pudemos observar que a transfecção transiente é factível mesmo sem a ajuda de DNA-carregador. Porém este tipo de transfecção poderia possibilitar alguns estudos de expressão do gene, sem aplicação direta na terapia gênica.

Os baixos rendimentos de transfecção nos causariam problemas com o longo tempo que levaríamos para obter a quantidade necessária de células e, conseqüentemente, o elevado número de duplicações dos queratinócitos. Outra desvantagem seria que o antibiótico de seleção afetaria de maneira negativa o crescimento e a transplantabilidade dos queratinócitos (101). Para os estudos onde foi necessária a seleção foi utilizada uma linhagem de queratinócitos tumorais (SCC-13) que é derivada de células de carcinoma escamoso de epiderme facial, as quais proliferam constantemente, pois perderam a capacidade de sofrer diferenciação normal e, portanto, não são afetadas pela seleção com G-418 o qual reduz o tempo de vida dos queratinócitos humanos normais acelerando sua diferenciação (144). Aprofundando estes conhecimentos McDaniel & Schults (95) estudaram o aumento de trocas de cromátides irmãs, tanto em células sensíveis como em células resistentes aos antibióticos aminoglicosídicos (geneticina e higromicina), chegando à conclusão que este índice aumenta, significativamente, podendo levar a potenciais efeitos adversos em células usadas em animais transgênicos e protocolos de terapia gênica humana. Este fato poderia explicar a aparente desvantagem que estas células selecionadas têm, quando retornam ao animal em experimentação escolhido como modelo para terapia gênica, podendo contribuir para a perda da população celular, ou ainda, incluindo mutações ou ativação de oncogenes (115).

Por todos os motivos até o momento mencionados, nos decidimos por uma mudança de estratégia para introduzir um transgene nos queratinócitos, direcionando nossos estudos para a infecção viral.

Alguns autores acreditam na possibilidade de que vetores virais possam provocar certa toxidez. Esta dúvida levou a uma evolução positiva pois provocou a pesquisa de vetores sintéticos, como por exemplo o vetor retrotransposon sintético, produzido recentemente por Chakraborty e colaboradores (25), o NVL3, que possui um promotor transcripcional LTR que expressa, constitutivamente, quantidades abundantes de RNA na maioria das células murinas, assim como em células humanas, diferindo significativamente da seqüência auxiliar do MoMLV (25); outro vetor de alto interesse é o AAV (vírus adeno-associado), pois seu local de integração já é conhecido, sendo uma pequena região do cromossomo 19 humano (96, 132).

Muitos autores dão preferência para a transferência gênica mediada por retrovírus, até para algumas doenças como a fibrose cística, onde a transferência gênica das células epiteliais das vias aéreas vem sendo feita com adenovírus (113). Esta preferência se deve à vantagem de se obter com os vetores retrovirais uma integração estável, resultando em expressão de longa duração do material genético transfectado, além de já terem sido aprovados para uso em protocolos clínicos em humanos (74).

Cada tipo celular responde de maneira diferente às tentativas de infecção retroviral e por este motivo podemos encontrar protocolos diversos na literatura. Portanto, é necessário tentar otimizar a metodologia de infecção para

cada sistema utilizado, alterando o tempo de contato, adicionando reagentes que aumentem a interação vírion - célula alvo, aumentando o número de reinfecções ou, ainda, utilizando células produtoras com altos títulos (74). Estes testes se tornam indispensáveis no nosso caso, onde nossas células alvo são provenientes de culturas primárias e não de linhagens celulares.

As bases iniciais para os estudos dos melhores parâmetros para a infecção dos queratinócitos, foram retiradas do trabalho de Garlick e colaboradores (57), o qual caracteriza a frequência de transferência gênica, o estado do DNA viral na célula alvo, os efeitos da expressão retroviral na viabilidade celular e a expressão dos genes transduzidos durante a diferenciação dos queratinócitos.

O gene da enzima bacteriana β -Galactosidase (β -gal) é um excelente marcador, pois não é encontrado naturalmente em células humanas. Portanto, após a reação com o substrato X-gal, podem-se visualizar, nitidamente, quais as células infectadas, já que estas desenvolvem uma coloração azul de fácil visualização. Assim escolhemos este gene como marcador para a padronização da infecção retroviral em culturas primárias de queratinócitos humanos normais.

Para esta padronização as células produtoras Am12/LBSN, derivadas da linhagem celular anfotrófica de empacotamento GP+envAm12, contendo a construção LBSN, que é o vetor retroviral LXSXN com o cDNA do gene da β -Galactosidase, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fulvio Mavilio. Pudemos portanto neste caso, passar diretamente à infecção dos queratinócitos.

Levando-se em conta a maior dificuldade de inserção do DNA em queratinócitos, com relação a outros tipos celulares, optamos por padronizar um método de infecção por contato das células produtoras com as células alvo. Aproveitando o fato dos queratinócitos utilizarem, para o seu desenvolvimento, uma camada de sustentação constituída de fibroblastos irradiados e que as células produtoras são derivadas, originalmente, de fibroblastos NIH-3T3, decidimos testar a possibilidade de utilização destas células produtoras como camada de sustentação para os queratinócitos. Todos os testes foram avaliados pela determinação do crescimento da população celular (**CC**) e pela eficiência de formação de colônias (**EFC**) dos queratinócitos em comparação com as culturas de queratinócitos em camada de sustentação constituída de fibroblastos 3T3-J2 irradiados com 60 Gy.

Inicialmente, variamos a concentração das células Am12/LBSN e a intensidade de irradiação para utilização destas como camada de sustentação. Como não obtivemos resultados satisfatórios, passamos a testar várias proporções de Am12/LBSN e 3T3-J2 para serem utilizadas como uma camada de sustentação mista, sempre com uma concentração fixa de queratinócitos.

A intenção destes experimentos era saber se as células Am12/LBSN podem ser utilizadas como camada de sustentação para os queratinócitos, permitindo, assim, a infecção direta destes pelo contato célula-célula.

Como a variação da intensidade de irradiação de 30 para 60 Gy não demonstrou uma alteração considerável nos índices estudados, optamos por manter 60 Gy como medida de segurança e, com uma mistura de Am12/LBSN e

3T3-J2 na proporção de 2:1, obtivemos índices **CC** e **EFC** comparáveis com o controle constituído somente de células 3T3-J2.

Utilizando os parâmetros acima descritos, passamos a determinar as melhores condições de infecção. Como as infecções retrovirais, normalmente, ocorrem em presença de polibreno, variamos as concentrações e o tempo de contato deste. O resultado observado foi que além de não aumentar o rendimento de infecção, ocasionava leve alteração morfológica e de crescimento dos queratinócitos; portanto optamos pela não utilização desta substância.

Os próximos testes foram de variação do tempo de infecção, quantidade de queratinócitos inicialmente semeados e duplo contato com as células infectivas.

Obtivemos os melhores níveis de infecção, associados às menores alterações nas culturas de queratinócitos, utilizando uma camada de sustentação mista de células produtoras de vetores retrovirais e fibroblastos 3T3-J2, na proporção de 2:1, respectivamente, 3 dias, repicando então os queratinócitos infectados para outra camada de sustentação constituída somente de

fizemos a clonagem das células infectadas. O fato de termos encontrado colônias provenientes de uma única célula inicialmente infectada, que passam a expressar a β -Galactosidase somente após a segunda ou terceira passagens (onde não existem mais vestígios das células produtoras), leva-nos a acreditar que conseguimos comprovar a nossa observação inicial.

Os queratinócitos de epiderme humana, após serem mantidos em cultura até atingirem a confluência, podem ser destacados do recipiente, obtendo-se uma membrana uniforme (41). Este enxerto, quando transplantado em contato com a derme do camundongo NUD, adere perfeitamente a esta última, iniciando seu desenvolvimento e multiplicação celular normal, formando várias camadas (8). Os queratinócitos portanto são um bom modelo para verificar a permanência da infecção "in vivo".

Com os resultados observados nos cortes histológicos efetuados nos transplantes de camundongos após a reação para determinação da presença da β -galactosidase, confirmamos, mais uma vez, a teoria de que os queratinócitos infectados só expressam a proteína quando perfeitamente adaptados ao meio, pois obtemos uma maior expressão após 16 dias com relação àquela após 9 dias. Estas células não poderiam ter sofrido uma infecção posterior, pois não se encontravam em contato com as células produtoras desde 15 dias antes da aplicação do enxerto, o qual era constituído exclusivamente de queratinócitos. A porcentagem de expressão se manteve, apesar de baixa (em torno a 10% das células), durante os dois meses de duração do experimento.

Após os estudos de padronização e expressão terem sido efetuados com uma enzima que se mantém no interior da célula, o próximo passo foi o preparo de células produtoras de uma proteína que fosse liberada da célula com possibilidade de entrar na circulação sistêmica quando incorporada a uma epiderme "in vivo". Para este experimento foi escolhida a Interleucina-6 humana, pois além de ser uma citocina que é liberada pelos queratinócitos para a via sistêmica em certas condições patológicas (117), não necessitaria de regulação dos seus níveis sanguíneos.

Para a infecção deste transgene nos queratinócitos, deveríamos preparar a construção viral e incorporá-la em células de empacotamento viral, obtendo as células produtoras. Existe a possibilidade de ocorrer uma produção indesejável dos vírus auxiliares (helper virus - contidos nas células de empacotamento viral), ainda que em baixa frequência, possivelmente, como resultado de recombinação do sistema de empacotamento com elementos de retrovírus endógenos (como DNA ou RNA) encontrados nas células de camundongo. Este fenômeno pode ser significativamente reduzido com maiores deleções nos vetores retrovirais ou nos plasmídeos que contêm os vírus auxiliares nas células de empacotamento, fazendo com que seja necessário um maior número de eventos (recombinações casuais) para formar um vírus ativo (99).

Markowitz e colaboradores (94) executaram testes extensivos comprovando que a utilização dos dois plasmídeos diversos (pgag-polgpt e penvAm), para a construção da sua linhagem anfotrófica de empacotamento viral,

levou à quase impossibilidade, ou seja, total negatividade nos testes executados, de uma recombinação. A produção viral indesejada requer, pelo menos três eventos de recombinação entre os plasmídeos auxiliares e o vetor retroviral para conduzir à formação do vírus de replicação competente. Este foi o sistema utilizado para o preparo das células de empacotamento (GP-E86 e GP-envAm12) por nós utilizadas.

Assim, passamos ao preparo da construção LhIL6SN a partir do vetor retroviral LXS_N. Este vetor foi incorporado às células de empacotamento viral ecotróficas (GP-E86), de maneira transiente e utilizando o sobrenadante destas para infectar as células de empacotamento viral anfotróficas GP-envAm12, com a obtenção das células produtoras do gene da interleucina-6. Após a seleção por 10 dias com G-418 e amplificação dos clones obtidos, foram titulados os clones com mais alta produção de hIL-6 (acima de 250 pg/cm²/dia). O clone amplificado e utilizado nos experimentos posteriores, foi aquele que apresentou um título de 3×10^5 ufc/ml e concentração de hIL-6 de 296 pg/cm²/dia, dando origem (após 3 meses) à linhagem de células produtoras de Interleucina-6 humana denominada **Am12/LhIL6SN**.

Com esta linhagem celular (**Am12/LhIL6SN**) infectamos os queratinócitos utilizando o protocolo já testado com as células Am12/LBSN, usando em paralelo estas últimas como controle, tanto positivo (coloração azul das células infectadas), quanto negativo (valores basais de hIL-6 no sobrenadante). Para sabermos se esta infecção foi permanente, não podemos, simplesmente, manter os queratinócitos em cultura por um ano pois não estamos

trabalhando com uma linhagem celular e sim com cultura primária de queratinócitos humanos normais. Portanto, o teste "in vitro" utilizado para determinar o caráter permanente da infecção foi a verificação da manutenção da expressão de hIL-6 dos queratinócitos infectados durante todo o tempo de vida destas células.

Os queratinócitos infectados sobreviveram a 15 passagens, com mais de 120 gerações celulares, durante um período de 95 dias, mostrando, inicialmente, um mesmo comportamento tanto para aqueles que continham o gene da hIL-6 quanto para os que continham o gene da β -Galactosidase. Porém, à partir da sétima passagem, os queratinócitos que produziam a enzima bacteriana começaram a apresentar uma diminuição mais acentuada da EFC, sendo que próximo ao final da sua vida celular houve uma aceleração do seu número de duplicações, com relação aos queratinócitos infectados com o gene humano. O número de passagens e gerações celulares dos queratinócitos infectados, está dentro da média obtida "in vitro" com queratinócitos humanos normais não infectados e a alteração encontrada nos queratinócitos infectados com o gene da β -galactosidase pode ser explicada, talvez, pela produção intracelular, por tão longo período de tempo, de uma enzima bacteriana, já que a quantidade de células infectadas se manteve por volta de 50% até o final da cultura.

As dosagens de hIL-6 demonstraram a manutenção destas concentrações, em média 500 ng por 10^6 células por dia, durante todo o tempo de vida celular, comprovando o caráter permanente da infecção. Os dados obtidos

com a simulação da infecção indicam que estes valores não sofrem interferência significativa a partir da segunda passagem após a infecção.

Para a verificação da capacidade da Interleucina-6 humana, produzida pelo queratinócitos infectados, em atingir a circulação sangüínea, foram preparados enxertos dos queratinócitos a partir da terceira passagem após a infecção. Estes enxertos foram implantados em camundongos NUD, com posteriores coletas do sangue destes animais, assim como retiradas destes enxertos para estudo histológico. Obtivemos níveis sangüíneos de hIL-6 de até 40 pg/ml após o terceiro dia do enxerto, níveis estes que foram decrescendo ao longo do tempo, porém com uma boa correlação com a deterioração dos enxertos verificada pelos cortes histológicos. Com estes estudos e considerando os parâmetros conhecidos, pudemos concluir que a proteína produzida pela epiderme humana infectada, reconstituída e enxertada é capaz de atingir a circulação em proporções de aproximadamente 6% dos valores produzidos no local. A diminuição destes valores ao longo do tempo se deve, provavelmente, à metodologia utilizada para o experimento "in vivo" e não à diminuição da expressão desta proteína pelos queratinócitos, já que esta metodologia (8) não foi concebida para experimentos de longa duração e o próprio autor (comunicação pessoal) não recupera o enxerto íntegro, após 15 dias.

Com a padronização da infecção retroviral e a prova da capacidade de uma proteína secretada pelos queratinócitos atingir a circulação, passamos ao

nosso objetivo final, ou seja, a produção do hormônio de crescimento humano pelos queratinócitos.

Iniciamos esta fase do trabalho com a construção retroviral do cDNA do hormônio de crescimento humano, sob o controle do promotor regulável da metalotioneína humana. Como já citado no início deste trabalho, os hormônios necessitam de um controle da sua concentração sanguínea e, por isso, optamos por acrescentar ao cDNA de hGH o promotor da metalotioneína que, como pudemos observar, tem um mecanismo operativo nos queratinócitos, podendo ser induzido por metais como por exemplo o zinco.

Para que este promotor pudesse funcionar na construção retroviral sem a interferência do promotor forte 5'-LTR, optamos por utilizar o vetor N2A que fornece uma dupla cópia do DNA de interesse na célula alvo. Desta maneira, uma das cópias ficaria a 5' do promotor LTR, podendo ser controlada pelo promotor da metalotioneína.

Após várias etapas intermediárias, obtivemos a construção retroviral **DChPMTGH**, a qual teve uma deleção de 27 bases entre o final do promotor da metalotioneína (imediatamente antes do ATG que queríamos eliminar) e o início do DNA do hGH. Teoricamente, esta perda não influencia a atividade promotora, pois não acarreta perda de nenhum sítio funcional, sendo que não se encontra dentro de nenhuma das regiões reguladoras (MREs ou GREs) deste promotor (55).

Com esta construção foram efetuadas transfecções, com e sem ativação posterior com zinco, que além de confirmar os baixos rendimentos e de

maneira transiente, nos permitiram testar em um curto espaço de tempo se a expressão derivada desta construção poderia ou não ser regulada por zinco. A transfecção foi efetuada quando os queratinócitos se encontravam em semiconfluência e a ativação com o zinco, imediatamente após 12, 24 e 48 horas do final da transfecção. Com este experimento demonstramos que a construção retroviral **DChPMTGH** funciona e que a produção do hormônio de crescimento pode ser aumentada de aproximadamente 10 vezes pela ativação com zinco, sendo que o pico máximo foi obtido após 24 horas do início da ativação.

Com esta construção preparamos as células produtoras para serem utilizadas na infecção dos queratinócitos, utilizando o mesmo protocolo da preparação da linhagem **Am12/LhIL6SN**. A capacidade de infecção dos clones positivos foi testada naqueles que produziam maior quantidade de hGH e o clone amplificado, para posterior utilização, foi aquele que apresentou um título de 3×10^5 ufc/ml e uma concentração maior que $50 \text{ ng/cm}^2/\text{dia}$.

Com estes procedimentos obtivemos a linhagem celular produtora do gene de hormônio de crescimento regulável **Am12/DChPMTGH**, pronta para infectar os queratinócitos.

Com esta linhagem celular (**Am12/DChPMTGH**) infectamos os queratinócitos utilizando o protocolo padronizado com as células Am12/LBSN e após a terceira passagem efetuamos a determinação qualitativa, por "Western blotting", do hGH no sobrenadante dos queratinócitos infectados, utilizando como controle positivo o hGH pituitário e como controle negativo o sobrenadante dos

queratinócitos não infectados. A autorradiografia revelou uma reação positiva ao anticorpo específico anti-hGH comparável qualitativamente ao controle positivo.

A determinação quantitativa do hormônio de crescimento humano produzido pelos queratinócitos infectados foi efetuada utilizando a técnica de radioimunoensaio, obtendo-se uma concentração média de $340 \text{ ng}/10^6 \text{ células}/\text{dia}$.

Pavlakis e colaboradores (118) obtiveram níveis basais (sem ativação) de hGH de 200 a 2500 ng/ml de meio de cultura de fibroblastos (linhagem C127) transfectados com o vetor BPV-MT-hGH. Estes dados não puderam ser comparados com os nossos pois não se encontravam na mesma unidade e a transfecção foi efetuada em linhagem estável de fibroblastos.

Seldem e colaboradores (136) obtiveram concentrações de hGH de até 160 ng/ml de soro na circulação do camundongo após 3 horas do implante intraperitoneal de 2×10^7 fibroblastos (células L) transfectados, não sendo apresentadas as concentrações obtidas no meio de cultura. Os mesmos autores, após um ano, publicaram outro trabalho onde são apresentadas concentrações de hGH de 500 ng/ml de meio de cultura dos fibroblastos transfectados de maneira transiente(137), porém estas quantidades correspondem a um acúmulo de 4 dias, refazendo os cálculos, de maneira a apresentá-las em uma unidade comparável à nossa, chegamos a uma concentração de aproximadamente $110 \text{ ng}/10^6 \text{ células}/\text{dia}$, portanto inferior àquela obtida por nós.

Os nossos resultados apresentaram concentrações de hGH superiores àquelas descritas na literatura por Morgan e colaboradores (102) de $72 \text{ ng}/10^6 \text{ células}/\text{dia}$ no meio de cultura de queratinócitos humanos infectados e selecionados com geneticina. Teumer e colaboradores (144) apresentaram

concentrações de hGH de 800-5300 ng/10⁶células/dia, porém esta infecção não foi efetuada em queratinócitos normais e sim em linhagem de carcinoma escamoso de epiderme facial (SCC-13) que prolifera indefinidamente, possibilitando a seleção com geneticina.

Quando estes queratinócitos foram ativados por 10 horas diariamente, obtivemos uma elevação dos valores basais de 2 vezes, aumentando para 4 vezes, quando mantivemos uma ativação constante.

Antes de concluirmos que a ativação constante pode ser utilizada, estes resultados devem ser aprofundados para verificação da manutenção da viabilidade celular ao longo do tempo.

Mesmo sem ativação do promotor com Zinco, obtivemos a maior produção de hGH em cultura primária de queratinócitos humanos transformados, já descrita na literatura e com ativação do promotor, o aumento desta produção foi compatível com o esperado.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que os queratinócitos podem ser usados como células alvo para terapia gênica, porém não podendo ser selecionados, tornam inviável a transfecção permanente para a introdução do transgene, apesar desta transfecção transiente ser válida para uma série de estudos importantes.

Podemos aproveitar o fato dos queratinócitos crescerem sobre uma camada de sustentação, constituída de fibroblastos, para aumentar o rendimento de infecção usando um protocolo que leva em conta o contato célula-célula, sendo que após a terceira passagem dos queratinócitos infectados a expressão da proteína se deve somente a estes.

Pelo método da infecção utilizando células produtoras, os queratinócitos expressam o produto transgênico de maneira permanente não só ao interno da célula, como também são capazes de secretá-los “in vitro”.

Não podemos concluir que a expressão é permanente “in vivo” devido à limitação da metodologia utilizada para este experimento. Portanto, uma das etapas futuras deste trabalho seria a otimização de uma nova técnica de enxerto de experimento “in vivo”, já que obtivemos concentrações sistêmicas razoáveis da produção transgênica e que sua diminuição foi acompanhada da deterioração do enxerto.

Preparamos uma construção retroviral do cDNA do hormônio de crescimento humano sob o controle do promotor de metalotioneína que demonstrou ser passível de regulação pela adição de zinco.

Com esta construção fomos capazes de preparar células produtoras e, com estas, infectar os queratinócitos e ativá-los, atingindo o nosso objetivo final obtendo queratinócitos infectados, capazes de produzir o hormônio de crescimento humano e esta expressão ser regulada pela adição de zinco.

Após a padronização do novo modelo para experimentação “in vivo”, o passo seguinte será preparar epiderme reconstituída “in vitro”, de queratinócitos humanos normais infectados de maneira a secretarem o hGH, enxertá-los em camundongos anões, ativando esta produção com zinco, e utilizando a dosagem quantitativa do hGH e do GH murino no sangue para determinar os níveis de GH endógeno e exógeno circulante. Obviamente, seria extremamente interessante também observar, mediante ensaios biológicos específicos (14), uma alteração no fenótipo deste mutante.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTSSON-WIKLAND, K.; JANSSON, C.; ROSBERG, S.; NOVAMO, A. Time-resolved immunofluorometric assay of human growth hormone. **Clin. Chem.** **39 (8)**: 1620-1625, 1993.
2. ALEXANDER, R. B.; ROSENBERG, S. A. Long term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice. **J. Immunol.** **145**: 1615-1620, 1990.
3. ANDERSON, W.F. Human gene therapy. **Science** **256**: 806-813, 1992.
4. ANDERSON, W.F. Prospects for human gene therapy. **Science** **226**: 401-409, 1984.
5. ARGENTON, F.; VIANELLO, S.; BERNARDINI, S.; JACQUEMIN, P.; MARTIAL, P.J.; BELAYEW, A.; COLOMBO, L.; BORTOLUSSI, M.; The transcriptional regulation of the growth hormone gene is conserved in vertebrate evolution. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** **192 (3)**: 1360-1366, 1993.
6. ARMENTANO, D.; THOMPSON, A. R.; DARLINGTON, G.; WOO, S. L. Expression of human factor IX in rabbit hepatocytes by retrovirus-mediated gene transfer: potential for gene therapy of hemophilia B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**: 6141-6145, 1990.
7. ASSIS, L.M.; TOLEDO, S.P.A.; SCHWARZ, I.; BARTOLINI, P.; MATTAR, E.; PIERONI, R.R. Terapêutica com hormônio de crescimento humano em nanismo pan-hipofisiotrófico idiopático hereditário. pesquisa e estimativa quantitativa de anticorpos. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo** **33**: 24-32, 1978.
8. BARRANDON, Y; LI, V; GREEN, H. New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. **J. Invest. Dermatol.**, **91**: 315-318, 1988.

9. BARTOLINI, P.; MORGANTI F. DIAS, L.; MURATA, Y. Produção de hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**,45, 1990.
10. BARTOLINI, P.; MORGANTI F. DIAS, L.; MURATA, Y.; RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; BELLINI, M.H.; SOARES C.R.J. Utilization of DNA recombinant techniques for the preparation of radioimmunoassay reagents for pituitary hormones. In: IAEA ed. **Developments in radioimmunoassay and related procedures**, IAEA-Vienna: 197-204, 1992.
11. BASERGA, R. Measuring parameters of growth. In: BASERGA, R. ed. **Cell growth and division: a practical approach**. IRL PRESS, Oxford University Press, 1989. p. 1-16.
12. BEDO, G.; SNATISTEBAN, P.; ARANDA, A. Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. **Nature** **339**: 231-234, 1989.
13. BELL, E.; EHRLICH, H.P.; BUTTLE, D.J.; NAKATSUJI, T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. **Science** **211**: 1052-1504, 1981.
14. BELLINI, M.H. & BARTOLINI, P. *In vivo* bioassay for the potency determination of human growth hormone in dwarf "little" mice. **Endocrinology** **132**: 2051-2055, 1993.
15. BLAESE, R.M. Lymphocytes for gene therapy. In: COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. eds. **Human gene transfer**. John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 1991. vol. 219, p. 137-145.
16. BLUME, E. Gene therapy trial finally begins. **News** **82**: 1601, 1990..
17. BODNER, M.; KARIN, M. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. **Cell** **50**: 267-275, 1987.

18. BORDIGNON, C.; FERRARI, G.; ROSSINI, S.; GIAVAZZI, F.; GILBOA, E.; MAVILIO, F. A human PBL/immunodeficient mouse model for "in vivo" preclinical studies of human gene therapy. In: COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. eds. **Human gene transfer**. John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 1991. vol. 219, p. 103-112.
19. BORDIGNON, C.; YU, S-T.; SMITH, C.A.; HANTZOPOULOS, P.; UNGERS, G.E.; KEEVER, C.A.; O'REILLY, R.J.; GIBOA, E. Retroviral vector-mediated high-efficiency expression of adenosine deaminase (ADA) in hematopoietic long-term cultures of ADA-deficient marrow cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 6748-6752, 1989.
20. BORENFREUND, E. & PUERNER, J.A. Toxicity determined "in vitro" by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicolog. Letters** **24**: 119-124, 1985.
21. BREM, G.; WANKE, R.; WOLF, E.; BUCHMÜLLER, T.; MÜLLER, M.; BREINIG, B.; HERMANN, W. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. **Mol. Biol. Med.** **6**: 531-547, 1989.
22. BROWN, A. M. C. & SCOTT, M. R. D. Retroviral vectors. In: - GLOVER, D. **DNA Cloning III: a practical approach**. IRL Press, 1987. p 189-212.
23. BURNETTE, W. N. "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Anal. Biochem.** **112**: 195-203, 1981.
24. C.E. NIH gives the go-ahead on genetic experiment. **Nature** **337**: 294, 1989.
25. CHAKRABORTY, A. K.; ZINK, M.A.; BOMAN, B.M.; HODGSON, A. C. Synthetic retrotransposon vectors for gene therapy. **FASEB J.** **7**: 971-977, 1993.

26. CHAMBERS, C. A.; KANG, J.; HOZUMI, N. Ectopic lymphokine gene expression in human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 1026-1030, 1992.
27. CHEN, E. Y.; LIAO, Y.-C.; SMITH, D. H.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; GELINAS, R. E.; SEEBURG, P. H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. **Genomics** **4**: 479-497, 1989.
28. CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MCDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **24**: 5294-5299, 1979.
29. COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. Introduction. In: COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. eds. **Human gene transfer**. John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 1991. vol. 219, p. 3-14.
30. COURNOYER, D.; SCARPA, M.; JONES, S. N.; MOORE, K. A.; BELMONT, J. W.; CASKEY, C. T. Gene therapy: a new approach for the treatment of genetic disorders. **Clin. Pharmacol. and Ther.** **47**: 1-11, 1990.
31. CULLITON, B. J. ADA gene therapy enters the competition. **Science** **249**: 975, 1990.
32. CULLITON, B. J. Conflict at the RAC. **Science** **247**: 159, 1990.
33. CULLITON, B. J. Designing cells to deliver drugs. **Science** **246**: 746, 1989.
34. CULLITON, B. J. Fighting cancer with designer cells. **Science** **244**: 1430-1433, 1989.
35. CULLITON, B. J. Gene test begins. **Science** **244**: 913, 1989.
36. CULLITON, B. J. Gene therapy: into the home stretch. **Science** **249**: 974, 1990.
37. CULLITON, B. J. Gene therapy clears 1st hurdle. **Science** **247**: 1287, 1990.

38. CULLITON, B. J. Gene transfer test: so far, so good. **Science** **245**: 1325, 1989.
39. CULLITON, B. J. One step closer for gene therapy. **Science** **248**: 1182, 1990.
40. CULLITON, B.J. Gene therapy begins. **Science** **249**: 1372, 1990.
41. DE LUCA, M. & CANCEDDA, R. Culture of human epithelium. **Burns** **18**: S5-S10, 1992.
42. DE LUCA, M.; ALBANESE, E.; BONDAZA, S.; MEGNA, M.; UGOZZOLI, L.; MOLINA, F.; CANCEDDA, R.; SANTI, P.L.; BORMIOLI, M.; STELLA, M.; MAGLIACANI, G. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. **Burns** **15**: 303-309, 1989.
43. DE LUCA, M.; ALBANESE, E.; MEGNA, M.; CANCEDDA, R.; MANGIANTE, P.E.; CADONI, A.; FRANZI, A. T. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. **Transplantation** **50**: 454-459, 1990.
44. DE LUCA, M.; D'ANNA, F.; BONDAZA, S.; FRANZI, A. T.; CANCEDDA, R. Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. **J. Cell Biol.** **107**: 1919-1926, 1988.
45. DE LUCA, M.; PELLEGRINI, G.; BONDAZA, S.; CREMONA, O.; SAVOIA, P.; CANCEDDA, R.; MARCHISIO, P.C. The control of polarized integrin topography and the organization of adhesion-related cytoskeleton in normal human keratinocytes depend upon number of passages in culture and ionic environment. **Exp. Cell Res.** **202**: 142-150, 1992.
46. DE LUCA, M.; SIEGRIST, W.; BONDAZA, S.; MATHOR, M.B.; CANCEDDA, R.; EBERLE, A.N. α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) stimulates normal human melanocyte growth by binding to high-affinity receptors. **J. Cell Sci.** **105**: 1079-1084, 1993.

47. DI MARCO, E.; BONDAZA, S.; MATHOR, M.B.; CUTULI, N.; MARCHISIO, P.C.; DE LUCA, M. CANCEDDA, R. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. **J. Biol. Chem.** **268**: 22838-22846, 1993.
48. DI MARCO, E.; MARCHISIO, P.C.; BONDANZA, S.; FRANZI, A. T.; CANCEDDA, R.; DE LUCA, M. Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. **J. Biol. Chem.** **266 (32)**: 21718-21722, 1991.
49. DIAMOND, D. J. AND GOODMAN, H. M. Regulation of growth hormone messenger RNA synthesis by dexametasone and triiodothyronine: transcriptional rate and mRNA stability changes in pituirary tumor cells. **J. Mol. Biol.** **181**: 42-62, 1985.
50. DICKMAN, S. Human gene therapy - 1st European experiment. **Nature** **348**: 378, 1990.
51. DRETZEN, G.; BELLARD, M.; SASSONE-CORSI, P.; CHAMBON, P. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. **Anal. Biochem.** **112**: 295-298, 1981.
52. FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabiling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** **132**: 6, 1983.
53. FENJVES, E.; GORDON, D.A.; PERSHING, L.K.; WILLIAMS, D.L.; TAICHMAN, L.B. Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 8803-8807, 1989.
54. FERRARI, G.; ROSSINI, S.; GIAVAZZI, R.; MAGGIONI, D.; NOBILI, N.; SOLDATI, M.; UNGERS, G; MAVILIO, F.; GILBOA, E.; BORDIGNON, C. An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency. **Science** **251**: 1363-1366, 1991.

55. FILMUS, J.; RENANI, J.; KLEIN, M.H. Synergistic induction of promoters containing metal- and glucocorticoid-responsive elements. **Nucl. Acids Res.** **20 (11)**: 2755-2760, 1992.
56. FLUG, F.; COPP, R.P.; CASANDOVA, J.; HOROWITZ, Z.D.; JANOCKO, L.; PLOTNIK, M.; SAMUEL, H.H. Cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. **J. Biol. Chem.** **262**: 6373-6382, 1987.
57. GARLICK, J.A.; KATZ, A.B.; FENJVES, E.S.; TAICHMAN, L.B. Retrovirus-mediated transduction of cultured epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.** **97**: 824-829, 1991.
58. GELLER, A.I. & FEDEROFF, H.J. The use of HSV-1 vectors to introduce heterologous genes into neurons: implications for gene therapy In: COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. eds. **Human Gene Transfer**. John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 1991 vol. 219, p. 63-73.
59. GELLER, A.I.; KEYOMARSI, K.; BRYAN, J.; PARDEE, A.B. An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors: potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**: 8950-8954, 1990.
60. GERRARD, A.J.; HUDSON, D.L.; BROWNLEE, G.G.; WATT, F.M. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. **Nature Genet.** **3**: 180-183, 1993.
61. GERSHON, D. Gene therapy - clinical trials next step. **Nature** **344**: 2, 1990.
62. GERSHON, D. Genetic engineering - transfer study expands. **Nature** **344**: 483, 1990.
63. GERSHON, D. Human gene therapy - anticancer trial's surprise approval. **Nature** **346**: 497, 1990.
64. GERSHON, D. Human gene therapy - approval next time round? **Nature** **345**: 468, 1990.

65. GORMAN, C.M.; MOFFAT, L.F.; HOWARD, B.H. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. **Mol. Cell Biol.** **2**: 1044-1051, 1982.
66. GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 5665-5668, 1979.
67. HABENER, J.F. Genetic control of hormone formation. In: **Willians textbook of endocrinology**. 8th Edition, 1992,. Wilson J. D. & Foster D. W. eds., W. B. Saunders Company, p 9-33.
68. HAMMER, R.E.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. **Nature** **311**: 65-67, 1984. .
69. HANTZOPOULOS, P.A.; SULLENGER, B.A.; UNGERS, G.; GILBOA, E. Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 3519-3523, 1989.
70. HARVEY, S.C.; Antiseptics and disinfectants; fungicides; ectoparasiticides. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A.G. **The pharmacological basis of therapeutics** 7th ed., 1985, MacMillan Publishing Company, p. 959-968.
71. HEMMILÄ, I.; DAKUBU, S.; MUKKALA, V-M.; SIITARI, H. AND LÖVGREN, T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assay. **Anal. Biochem.** **137**: 335-343, 1984.
72. JIANG, C.-K.; CONNOLLY, D.; BLUMENBERG, M. Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.** **97**: 969-973, 1991.
73. JOHNSON, L.G.; OLSEN, J.C.; SARKADI, B.; MOORE, K.L.; SWANSTROM, R.; BOUCHER, R.C. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. **Nature Gen.** **2**: 21-25, 1992.

74. KAHN, M.L.; LEE, S.W.; DICKEK, D.A. Optimization of retroviral vector-mediated gene transfer into endothelial cells *in vitro*. **Circ. Res.** **71**: 1508-1517, 1992.
75. KASID, A.; MORECKI, S.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K.; CULVER, K.; FREEMAN S.; DIRECTOR, E.; LOTZE, M.T.; BLAESE, R.M.; ANDERSON, W.F.; ROSENBERG, S.A. Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**: 473-477, 1990.
76. KAY, M.A.; PONDER, K.P.; WOO, S.L.C. Human gene therapy: present and future. **Breast Cancer Res. and Treat.** **21**: 83-93, 1992.
77. KAY, M.A.; ROTHENBERG, S.; LANDEN, C.N.; BELLINGER, D.A.; LELAND, F.; TOMAN, C.; FINEGOLD, M.; THOMPSON, A.R.; READ, M.S.; BRINKHOUS, K.M.; WOO, S.L.C. In vivo gene therapy of Hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. **Science** **262**: 117-119, 1993.
78. KERSHAW, W.C.; LEHMAN-McKEEMAN, L.D.; KLAASSEN, C.D. Hepatic isometallothioneins in mice: induction in adults and postnatal ontogeny. **Toxicol. Applied Pharm.** **104**: 267-275, 1990.
79. KESSLER, D.A.; SIEGEL, J.P.; NOGUCHI, P.D.; ZOOM, K.C.; FEIDEN, K.L.; WOODCOCK, J. Regulation of somatic-cell therapy and gene therapy by the food and drug administration. **N. Engl. J. Med.** **329 (16)**: 1169-1173, 1993.
80. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** **227**: 680-685, 1970.
81. LANDER, E. S.; LODISH, H. Mitochondrial diseases: gene mapping and gene therapy. **Cell** **61**: 925-926, 1990.
82. LEFEVRE, C.; IMAGAWA, M.; DANA, S.; GRINDLAY, J.; BODNER, M.; KARIN, M. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. **EMBO** **6**: 971-981, 1987.

83. LEMAIGRE, F. P.; PEERS, B.; LAFONTAINE, D.A.; MATHY-HARTERT, M.; ROUSSEAU, G. G.; BELAYEW, A.; MARTIAL, J. A. Pituitary-specific factor binding to the human prolactin, growth hormone, and placental lactogen genes. **DNA 8**: 149-159, 1989.
84. LEWIN, B. Retroviroses and retroposons. In: LEWIN, B. **Genes IV**. Oxford University Press and Cell Press. p 672-690, 1990.
85. MANGALAM, H. J.; ALBERT, V. R.; INGRAHAM, H. A.; KAPILOFF, M.; WILSON, L.; NELSON, C.; ELSHOLTZ, H.; ROSENFELD, M. G. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally **Genes & Development 3**: 946-958, 1989.
86. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Expression of proteins. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.. p 16.12.
87. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Extraction and purification of plasmid DNA. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., p 1.21-1.52.
88. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Introduction of recombinant vectors into mammalian cells In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., p 16.30-16.55.
89. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Hybridization of radiolabeled probes to immobilized nucleic acids. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., p 9.47-9.55.
90. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Strategies for studying gene regulation. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., p 16.56-16.67.
91. MANN, R.; MULLIGAN, R.C.; BALTIMORE, D, Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell 33**: 153-159, 1983.

92. MARCUS, R. & COULSTON, A.M. The vitamins. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A.G. **The pharmacological basis of therapeutics** 7th ed., 1985, MacMillan Publishing Company, p. 1544-1551.
93. MARKOWITZ, D.; GOFF, S.; BANK, A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. **J. Virology** **62**: 1120-1124, 1988.
94. MARKOWITZ, D.; GOFF, S.; BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line . **Virology** **167**: 400-406, 1988.
95. McDANIEL, L.D. & SCHULTS, R.A. Elevation of sister chromatid exchange frequency in transformed human fibroblasts following exposure to widely used aminoglycosides. **Environm. Mol. Mut.** **21**: 67-72, 1993.
96. McLAUGHLIN, S.K.; COLLIS, P.; HERMONAT, P.; MUZYCZKA, N. Adeno-associated virus general transduction vector: analysis of proviral structures. **J. Virol.** **63**: 1963-1973, 1988.
97. MIGLIACCIO, G.; PASCALE, M.C.; LEONE, A.; BONATTI S. Biosynthesis, membrane translocation, and surface expression of Sindbis virus E1 glycoprotein. **Exp. Cell Res.** **185**: 203-216, 1989.
98. MILLER, A. D. Progress toward human gene therapy. **Blood** **76 (2)**: 271-278, 1990.
99. MILLER, A.D. & BUTTIMORE, C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. **Mol. Cel. Biol.** **6 (8)**: 2895-2902, 1986.
100. MILLER, A.D. & ROSMAN G.J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. **Biotechniques** **7**: 980-990, 1989.
101. MORGAN, J. R. & EDEN, C. A. Retroviral-mediated gene transfer into transplantable human epidermal cells. In: **Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds**, 1991, Wiley-Liss, Inc. p. 417-428.

102. MORGAN, J. R.; BARRANDOM, Y.; GREEN, H.; MULLIGAN, R. C. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. **Science** **237**: 1476-1479, 1987.
103. MORGAN, R.A. & ANDERSON, F. Human gene therapy. **Annu. Rev. Biochem.** **62**:191-217, 1993
104. MULLIGAN, R.C. The basic science of gene therapy. **Science** **260**: 926-932, 1993.
105. NABEL, E. G.; PLAUTZ, G.; BOYCE, F. M.; STANLEY, J. C.; NABEL, G. J. Recombinant gene expression *in vivo* within endothelial cells of the arterial wall. **Science** **244**: 1342-1344, 1989.
106. NABEL, E. G.; PLAUTZ, G.; NABEL, G. J. Site-specific gene expression *in vivo* by direct gene transfer into the arterial wall. **Science** **249**: 1285-1288, 1989.
107. NACHTIGAL, M. W.; NICKEL, B. E.; KLASSEN, M. E.; ZHANG, W.; EBERHARDT, N. L.; CATTINI, P.A. Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumour cells is dependent on proximal promoter sequences. **Nucleic Acids Res.** **17(11)**: 4327-4337, 1989.
108. NELSON C.; ALBERT, V. R.; ELSHOLTZ, H. P.; LU, L.; ROSENFELD, M. G. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. **Science** **239**: 1400-1405, 1988.
109. NELSON C.; CRENSHAW III, E. B.; FRANCO, R.; LIRA, S. A.; ALBERT, V. R.; EVANS, R. M.; ROSENFELD, M. G. Discrete cis-active genomic sequences dictate the pituitary cell type-specific expression of rat prolactin and growth hormone genes. **Nature** **322**: 557-562, 1986.
110. NEWGARD, C.B. Cellular engineering for the treatment of metabolic disorders: prospects for therapy in diabetes. **Biotechnology** **10**: 1112-1120, 1992.

111. NORMAN, M.F.; LAVIN, T.N.; BAXTER, J.D.; WEST, B.L. The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. **J. Biol. Chem.** **264**:12063-12073, 1989.
112. OGURA, H.; TANI, K.; OZAWA, K.; NAGATA, S.; ASANO, S.; TAKAKU, F. Implantation of genetically manipulated fibroblasts into mice as antitumor α -interferon therapy. **Cancer Research** **50**: 5102-5106, 1990.
113. OLSEN, J.C.; JOHNSON, L.G.; WONG-SUN, M.L.; MOORE, K.L.; SWANSTROM, R.; BOUCHER, R.C. Retrovirus-mediated gene transfer to cystic fibrosis airway epithelial cells: effect of selectable marker sequences on long-term expression. **Nucl. Acids Res.** **21** (3): 663-669, 1993.
114. ORIAN, J.M.; TAMAKOSHI, K.; MACKAY, I.R.; BRANDON, M.R. New murine model for hepatocellular carcinoma: transgenic mice expressing metallothionein-ovine growth hormone fusion gene. **J. Natl. Cancer Inst.** **82**: 393-398, 1990.
115. PALMER, T.D.; ROSMAN, G.J.; OSBORNE, W.R.A.; MILLER, A.D. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 1330-1334, 1991.
116. PALMITER, R.D.; NORSTEDT, G.; GELINAS, R.E.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. **Science** **222**: 809-814, 1983.
117. PARTRIDGE, M.; CHANDRY, D.; TURNER, M.; FELDMAN M. Production of interleukin-1 and interleukin-6 by human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. **J. Invest. Dermatol.** **96**: 771-776, 1991.
118. PAVLAKIS, G.N. & HAMER, D.H. Regulation of a metallothionein-growth hormone hybrid gene in bovine papilloma virus. **Proc. Natl. Acad. USA** **80**: 397-401, 1983.

119. PENDERGRASS, W.R.; LI Y.; JIANG, De Z.; WOLF, N.S. Decrease in cellular replicative potencial in "giant" mice transfected with the bovine growth hormone gene correlates to shortened life span. **J. Cel. Phys.** **156**: 96-103, 1993.
120. PITTELKOW, M.R.; COOK, P.W.; SHIPLEY, G.D.; DERYNCK, R. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. **Cell Growth Diff.** **4**: 513-521,1993.
121. RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature** **265**: 421-424, 1977.
122. RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell** **6**: 331-344, 1975.
123. RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a doned cell line derived from a teratoma. **Cell** **6**: 317-330, 1975.
124. RIBELA, M.T.C.P.;MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D. & BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. **J. Immunol. Methods** **159**: 269-274, 1993.
125. ROCHAT, A.; KOBAYASHI, K. & BARRANDON, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. **Cell** **76**: 1063-1073, 1994.
126. ROMAGNOLI, G.; DE LUCA, M.; FARANDA, F.; BANDELLONI, R.; FRANZI, A.T.; CATALIOTTI, F.; CANCEDDA, R. Treatment of posterior hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium. **N. Engl. J. Med.** **323**: 527-530, 1990.
127. ROSENBERG, S.A.; AEBERSOLD P.; CORNETTAR. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **N. Engl. J. Med.** **323**: 570-578, 1990.

128. ROSEMBERG, S.A.; ANDERSON, F.; BLAESE, M.; HWU, P.; YANELLI, J.R.; YANG, J.C.; TOPALIAN, S.L.; SCHWARTZENTRUBER, D.J.; WEBER, J.S.; ETTINGHAUSEN, S.E.; PARKINSON, D.N.; WHITE, D.E. The development of gene therapy for the treatment of cancer. **An. Surg.** **218 (4)**: 455-464, 1993.
129. ROSENFELD, M.A.; SIEGFRIED, W.; YOSHIMURA, K.; YONEYAMA, K.; FUKAYAMA M.; STIER, L.E.; PÄÄKKÖ, P.K.; GILARDI, P.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.D.; PERRICAUDET, M.; JALLAT, S.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.-P.; CRYSTAL, R.G. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant α 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. **Science** **252**: 431-434, 1991.
130. ROSENFELD, M.A.; YOSHIMURA, K.; TRAPNELL, B.C.; YONEYAMA, K.; ROSENTHAL, E.R.; DALEMANS, W.; FUKAYAMA M.; BARGON, J.; STIER, L.E.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.D.; PERRICAUDET, M.; GUGGINO, W.B.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.-P.; CRYSTAL, R.G. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. **Cell** **68**: 143-155, 1992.
131. SALVATORI, G.; FERRARI, G.; MEZZOGIORNI, A.; SERVIDEI, S.; COLETTA, M.; TONALI, P.; GIAVAZZI, R.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers "in vivo". **Hum. Gene Ther.** **4**: 713-723, 1993.
132. SAMULSKI, J.; ZHU, X.; XIAO, X.; BROOK, J.D.; HOUSMAN, D.E. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. **EMBO. J.** **10**: 3941-3950, 1991.
133. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSTON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 5463-5467, 1977.
134. SEARLE, P.F. Zinc dependent binding of a liver nuclear factor to metal response element MRE-a of the mouse metallothionein-I gene and variant sequences. **Nucl. Acids Res.** **18 (16)**: 4683-4690, 1990.

135. SÉGUIN, C.; FELBER, B.K.; CARTER, A.D.; HAMER, D.H. Competition for cellular factors that activate metallothionein gene transcription. **Nature** **312**: 781-785, 1984.
136. SELDEN, R. F.; SKOSKIEWICZ, M. J.; HOWIE, K. B.; RUSSELL, P. S.; GOODMAN, H. M. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. **Science** **236**: 714-718, 1987.
137. SELDEN, R. F.; WAGNER T. E.; BLETHEN, S.; YUN J. S.; ROWE, E.; GOODMAN, H. M. Expression of the human growth hormone variant gene in cultured fibroblasts and transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**: 8241-8245, 1988.
138. SITTLER, A. M. AND REUDELHUBER, T. I. Tissue-specific expression of the rat growth hormone gene is due to the interaction of multiple promoter, not enhancer, elements. **DNA and Cell Biol.** **9**: 511-518, 1990.
139. SOINI, E. AND KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - A new generation of nonisotopic immunoassays. **Clin. Chem.** **29**: 65-68, 1983.
140. STEFANEANU, L.; KOVACS, W.; BARTKE, A.; MAYERHOFER, A.; WAGNER, T.E. Pituitary morphology of transgenic mice expressing bovine growth hormone. **Lab. Invest.** **68 (5)**: 584-591, 1993.
141. STRATFORT-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. Gene transfer into animals: the promise of adenovirus In: COHEN-HAGUENAUER, O. & BOIRON, M. eds. **Human Gene Transfer.**, John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 1991. vol. 219: 51-61.
142. SUHR, S.T. & GAGE, F.H. Gene therapy for neurologic disease. **Arch. Neurol.** **50**:1252-1268, 1993.
143. TEPPER, R.I.; COFFMAN, R.L.; LEDER, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. **Science** **257**: 548-551, 1992.

144. TEUMER, J.; LINDAHL, A.; GREEN, H. Human growth hormone in the blood of athymic mice grafted with cultures of hormone-secreting human keratinocytes. **FASEB J.** **4**: 3245-3250, 1990.
145. TOLSTOSHEV, P. Gene therapy, concepts, current trials and future directions. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **32**: 573-596, 1993.
146. TRAHAIR, J. F.; NEUTRA, M.R.; GORDON, J.I. Use of transgenic mice to study the routing of secretory proteins in intestinal epithelial cells - analysis of human growth hormone compartmentalization as a function of cell type and differentiation. **J. Cell Biol.** **109**: 3231-3242, 1989.
147. TRIPPUTI, P.; GUÉRIN, S. L.; MOORE, D. D. Two mechanisms for the extinction of gene expression in hybrid cells. **Science** **241**: 1205-1207, 1988.
148. TRIPPUTI, P.; GUERIN, S.; MOORE, D. Cell-type-specific regulation of growth hormone gene expression. In: MULLER, E. ed. **Advances in Growth Hormone and Growth Hormone Factor Research**. Springer-Verlag, N. Y, 1988.
149. VERMA, I. M. Gene therapy. **Scientific American** **263**: 34-41, 1990.
150. VOGEL, J.C. Keratinocyte gene therapy. **Arch. Dermatol.** **129**: 1478-1483, 1993.
151. WATT, F.M. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. **Cell Biology** **1**: 1107-1115, 1989.
152. WINBERG, G. & HAMMARSKJOLD, M.-L. Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. **Nucl. Acids Res.** **8**: 253-264, 1980.
153. WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science** **247**: 1465-1468, 1990.
154. WU, B.; HUNT, C.; MORIMOTO, R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. **Mol. Cell. Biol.** **5**: 330-341, 1985.

155. ZAMBRUNO, G.; BIANCHI, B.; GIANNETTI, A. Le citochine epidermiche **G. Ital. Dermatol. Venereol.** **129**: 1725-1757 , 1994.
156. ZWIEBEL, J. A.; FREEMAN, S. M.; CORNETTA, K.; FOROUGH, R.; MACIAG, T.; ANDERSON, W. F. Recombinant gene expression in human umbilical vein endothelial cells transduced by retroviral vectors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **170 (1)**: 209-213, 1990.
157. ZWIEBEL, J. A.; FREEMAN, S. M.; KANTOFF, P. W.; CORNETTA, K.; RYAN, U. S.; ANDERSON, W. F. High-level recombinant gene expression in rabbit endothelial cells transduced by retroviral vectors. **Science** **243**: 220-222, 1989.
158. ZWIEBEL, J.A.; SU, N.; MacPHERSON, A.; DAVIS, T.; OJEIJO, J.O. The gene therapy of cancer: transgenic immunotherapy. **Sem. Hemat.** **30 (4)**:119-129, 1993.