

P 4161**Otimização do protocolo de transfecção em células-tronco mesenquimais humanas**

Felipe Mateus Pellenz, Talita Giacomet de Carvalho, Alvaro Macedo Laureano, Lucia Mariano da Rocha Silla, Guilherme Baldo, Ursula da Silveira Matte

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Introdução: As células-tronco mesenquimais humanas (hMSC) estão presentes em diversos tecidos e são multipotentes. São amplamente usadas em medicina regenerativa, e são ótimas candidatas à manipulação genética para terapia gênica, pois além da capacidade de migração e diferenciação, são capazes de suprimir a resposta imune no hospedeiro. Entretanto, as hMSC são células de difícil transfecção por métodos convencionais. Na eletroporação grande parte das células não sobrevivem ao procedimento. A lipofecção é um método rápido, simples e com baixa citotoxicidade. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é otimizar um protocolo de transfecção de hMSC. **Métodos:** Para isso, hMSC derivadas de medula óssea foram plaqueadas em placas de 24 poços e, 24 h depois, transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da GFP (green fluorescent protein). A eletroporação foi realizada com concentrações celulares variando de $0,5 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^6$ células/poço, utilizando 60µg de DNA, sendo eletroporadas a 350V, 950µF, 200Ω. Foram testadas diferentes condições de lipofecção, tais como três quantidades de Lipofectamina 3000 (0,75µL/poço, 1,5µL/poço e 3,0µL/poço), duas quantidades de DNA (500ng/poço e 1000ng/poço) e concentrações celulares iniciais variando de $0,125 \times 10^6$ a $2,0 \times 10^6$ células por poço. Os experimentos foram repetidos em diferentes passagens celulares (da 3 a 9), e todos foram feitos em triplicatas. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram tripsinizadas e submetidas à citometria de fluxo para detecção da porcentagem de células fluorescentes (GFP-positivas) em relação à população total. **Resultados:** A melhor eficiência de transfecção obtida após os protocolos de eletroporação foi de 15% de células GFP-positivas, e foi obtida com $1,0 \times 10^6$ células/poço e 60µg de DNA. A eficiência de transfecção após lipofecção variou de 0% a 26% de células GFP-positivas em relação à população total. No protocolo que mostrou ser o mais eficiente, modificando aproximadamente 26% das células, foram plaqueadas $0,25 \times 10^6$ células por poço, e foram transfectadas com 1µg de DNA e 1,5µl de lipofectamina. **Conclusões:** Entre os dois métodos testados, a lipofectamina mostrou ser a mais eficiente para a transfecção de hMSC, quando utilizados parâmetros específicos. O protocolo otimizado apresentou resultados satisfatórios e, em geral, superiores aos descritos em outros trabalhos utilizando lipofecção em hMSC. **Palavras-chaves:** Células-tronco mesenquimais, transfecção, lipofecção. Projeto CEP HCPA