

TERAPIA GÊNICA PARA DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO:. Balestrin RC , M Vieira , R Sano , J Coelho , A d'Azzo , R Giugliani , U Matte . Centro de TERAPIA GÊNICA - Centro de pesquisas . HCPA.

A Gangliosidose GM1 -galactosidase. Esta enzima é responsável pela degradação de gangliosídeo GM1. É uma das doenças lisossômicas de depósito mais frequentes no Brasil. Até o presente momento não há tratamento efetivo para a Gangliosidose GM1. Estudos in vitro e em animais têm demonstrado a potencialidade da terapia gênica, baseando-se no fato de que a enzima liberada na corrente sanguínea pode ser captada por células deficientes e direcionada aos lisossomos. O presente trabalho tem como objetivo transfectar fibroblastos de pacientes com Gangliosidose GM1 com o cDNA normal e verificar a correção do defeito enzimático. Foi realizada uma transfecção transitória, utilizando como vetor pSCTOP e outra estável, como vetor pREP9, permitindo a avaliação da eficiência de correção do defeito bioquímico por maior tempo. O cDNA da foi clonado nos vetores de expressão pSCTOP e pREP9, sob controle do promotor de CMV. As transfecções foram realizadas utilizando LipofectAMINETM Plus. Células de indivíduos sem GM1 foram utilizadas como controles para detecção dos padrões normais. Quanto à transfecção estável, ainda está se padronizando a dose ótima, o tempo de transfecção e a concentração ideal do lipídeo usados no experimento. Após a transfecção transitória as células foram mantidas em cultura e coletadas após 24h e uma semana. A atividade enzimática foi realizada em lisado celular e no meio de cultura utilizando método fluorimétrico. Após 24h da transfecção transitória, os valores médios de atividade enzimática detectados (2.892,02 nmoles/h/mg prot.) foram muito superiores aos valores encontrados nas células não tratadas (27,6 nmoles/h/mg prot.) e nos controles normais (1.298,07 nmoles/h/mg prot.). Nas células mantidas em cultivo por uma semana, os valores foram semelhantes aos valores observados nos pacientes (24,105 nmoles/h/mg prot.). A análise de RT-PCR após uma semana de cultivo não demonstrou expressão do transgene. Estes resultados preliminares demonstram a correção do defeito -Gal, sem toxicidade do método de transfecção bioquímico pela adição do cDNA da transitório. Porém para que possam ser realizados todos os testes de avaliação da eficiência de correção do defeito bioquímico esperamos a realização da transferência estável permitindo obter um maior número suficiente de células transfectadas e por maior tempo. APOIO: Bolsista CNPq, FIPE/HCPA.