

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

TERAPIA GÊNICA PARA DOENÇAS LISOSSÔMICAS:
UMA ABORDAGEM INOVADORA PARA O
TRATAMENTO DA GANGLIOSIDOSE GM1

Raquel Cristina Balestrin

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani
Co-Orientadora: Dra. Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, fevereiro de 2005.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Terapia Gênica localizado no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA/UFRGS com recursos do CNPq, FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) – HCPA, FAPERGS e Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia RS.

**Nenhuma teoria ou ciência do mundo
ajuda tanto uma pessoa
quanto um outro ser humano
que não tem medo de abrir o coração
para seu semelhante.**

Elisabeth Kübler-Ross, M.D.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, pela confiança e oportunidade de estar realizando este sonho sem nem mesmo me conhecer. Principalmente, por todo incentivo me mostrando o caminho para muitas realizações. Terei-o como um grande exemplo para o resto da minha vida profissional e pessoal.

À Dra. Ursula da Silveira Matte, que foi parte fundamental para realização deste trabalho. Por estar sempre disponível não só para dividir seus conhecimentos, mas para ouvir e auxiliar-me com muita dedicação em todos os momentos que precisei. Obrigada pela confiança, compreensão, paciência e todos minutos dedicados a mim e este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do HCPA, pela paciência, carinho, bom humor, ajudas e é claro “os chimarrões” que tornavam os dias de trabalho bem mais alegres. Levarei vocês para sempre no meu coração porque vocês não são apenas colegas e sim uma família.

Meu muito obrigada especial, ao Matheus pelas horas dedicadas me iniciando na cultura celular, a Cris pelos vários “quebra-galhos” sempre que preciso, principalmente pela amizade e o ombro sempre que necessário, ao Antônio que além de colega de laboratório um grande amigo e parceria em vários momentos extra laboratório.

Aos amigos do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial aos Laboratórios de Erros Inatos do Metabolismo e de Cultura Celular.

A todos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e do Programa de Pós-Graduação em Medicina pela dedicação e pelo conhecimento adquirido.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de ótima qualidade e principalmente ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular que tornou possível a realização de um grande sonho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado que tornou possível morar em Porto Alegre e me dedicar a este trabalho.

Ao Elmo e à Ellen pela dedicação, carinho, estímulo e por estarem sempre dispostos com um sorriso no rosto a ajudar no que fosse necessário.

À Profa. Dra. Marion Schiengold por ser esta pessoa maravilhosa que mostrou-me como é gostoso dar aula, incentivando-me e ensinando-me durante meu estágio didático. Se me tornarei uma boa professora com certeza devo muito a sua ajuda.

À Francine Marques pela ajuda na preparação das práticas durante o estágio didático, se não fosse tu Fran não sei o que seria de todos aqueles cruzamentos em *Drosophila*.

À Taiana e à Valéria pela paciência, compreensão, carinho e amizade, principalmente quando a semana de limpeza do apto era minha. Taia obrigada por ser essa maninha maravilhosa em todas as horas. Val valeu pelo computador, sem ele teria sido muito mais difícil.

Aos amigos (não mencionarei, que por sorte são muitos e estão no meu coração), pela amizade sincera, pelas palavras de consolo, pelo encorajamento, incentivo e parceria nas horas que tanto precisei. Além de toda ajuda nos momentos difíceis, valeu as inesquecíveis festas, as risadas e os intermináveis papos. Adoro muito vocês e sem a presença de vocês com certeza não teria chegado aqui e não seria quem hoje sou.

Ao meu amor, Jojoba por seu apoio, amor incondicional nestes últimos meses. Sem esquecer da paciência e compreensão nos momentos mais difíceis. E principalmente por dar-me o equilíbrio emocional que necessitava e foi imprescindível para finalização deste trabalho.

Aos meus pais José e Eliane e meu mano Rafa pelo estímulo, amor e por compreenderem que apesar da distância e a ausência, o carinho continuou vivo. A vocês dedico com muito carinho este trabalho e agradeço pelo apoio constante

em todos momentos da minha vida. Amo vocês e espero deixá-los cada vez mais orgulhosos de mim.

Esta dissertação teve apoio de muitas pessoas que participaram de uma forma ou de outra na minha vida. Caso eu tenha esquecido alguém, desculpe. E a todos o meu muito, **MAS MUITO MESMO...**

...OBRIGADA!!!!

ÍNDICE

Lista de tabelas	x
Lista de figuras	xi
I. Resumo	xii
II. Abstract	xiii
III. Introdução	14
III.1. Erros Inatos do Metabolismo (EIM).....	14
III.2. Doenças Lisossômicas (DL)	15
III.3. Esfingolipidoses	17
III.4. Gangliosidose GM1	20
III.4.1.Epidemiologia	20
III.4.2.Aspectos Clínicos	21
III.4.3.Diagnóstico	22
III.4.4.Aspectos Bioquímicos	23
III.4.5.Aspectos Genéticos e Moleculares	25
III.4.6.Modelos Animais	26
III.4.7.Tratamento	28
III.5. Terapia Gênica	30
III.5.1.Breve Histórico	30
III.5.2.Transferência Gênica	31
III.5.2.1. Vetores	33
III.5.2.2. Vetores virais	35
III.5.2.3. Vetores não-virais.....	36
III.5.2.3.1 Lipossomos catiônicos	38
IV. Objetivos	41
V. Artigo: “CORRECTION OF ACID <i>BETA</i> -GALACTOSIDASE DEFICIENCY IN FIBROBLASTS FROM GM1 GANGLIOSIDOSIS PATIENTS BY NON-VIRAL GENE DELIVERY”	42

VI. Discussão	61
VII. Referências Bibliográficas	70
VIII. Apêndice	87
VIII. 1. Procedimentos laboratoriais	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de características clínicas e bioquímicas da Gangliosidose GM1	22
Tabela 2: Sinais clínicos de cães Shiba com Gangliosidose GM1.....	27
Tabela 3: Comparação das propriedades de diversos sistemas de vetores.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Catabolismo de esfingolípídeos em doenças lisossômicas	16
Figura 2: Esquema mostrando o possível mecanismo de dano ao SNC por acúmulo de GSL	19
Figura 3: Distribuição dos testes clínicos de terapia gênica em relação às suas indicações	31

I. RESUMO

A Gangliosidose GM1 é causada pela deficiência da β -galactosidase, que degrada o gangliosídeo GM1. Esta é uma doença lisossômica muito freqüente no sul do Brasil. Estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado a potencialidade da terapia gênica, como a enzima secretada na circulação pode ser captada por células deficientes. Nós transfectamos células de pacientes com GM1 com o cDNA normal e observamos a correção do defeito metabólico. O cDNA B-Gal foi clonado nos vetores de expressão pSCTOP e pREP9. A transfecção foi realizada com o reagente LIPOFECTAMINE 2000. As células foram cultivadas e coletadas 24h, 48h e 1 semana após a transfecção transitória e em 4 semanas para a estável. A atividade enzimática foi medida em meio e células por ensaio fluorimétrico. Após 24h, a atividade enzimática observada nas células transfectadas foi 6x a 10x maior do que nas células não-tratadas (69,86 nmoles/h/mg prot.) e menor que os controles normais (1.339,5 nmoles/h/mg prot.). Estes resultados mostram a correção do defeito bioquímico por adição do cDNA da β -gal, com baixa toxicidade do sistema de transfecção e a atividade enzimática restaurada a níveis equivalentes ao de indivíduos heterozigotos.

II. ABSTRACT

GM1 Gangliosidosis is caused by the deficiency of β -Galactosidase (β -Gal), that degrades GM1 ganglioside. It's a lysosomal storage disorder frequent in Brazil, with a carrier frequency of 1:67. Both *in vitro* and animal studies showed the potential for gene therapy of this disease, as the enzyme is secreted and can be captured by deficient cells and targeted to the lysosomes. We have transfected cells from GM1 patients with the normal β -Gal cDNA and observed the correction of the metabolic defect. β -Gal cDNA was cloned into the expression vectors pSCTOP and pREP9. Transfection was performed using LIPOFECTAMINE 2000. After transfection, cells were cultured and harvested after 24h, 48h and one week for transient expression and more four weeks for stable expression. Enzyme activity was measured in cell lysate and medium by fluorometric assay. After 24h, observed enzyme activity was 6 to 10 fold higher than in untreated cells but lower than normal controls. These results show the correction of the biochemical defect by the administration of β -Gal cDNA, with low toxicity of the transfection system and the restoring of enzyme activity to equivalent levels of heterozygotes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)