



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS LISSOSSÔMICAS

Lagranha, Valeska Lizzi ¹; Baldo, Guilherme ¹; Artigalás, Osvaldo ¹; Carvalho, Talita ¹, Mayer, Fabiana ¹; Schwartz, Ida ²; Rojas, Verônica ²; Burin, Maira ¹; Giugliani, Roberto ^{1,2}; Matte, Ursula ¹.

1-Centro de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

2-Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

Tratamentos atuais para as doenças lisossômicas (DL) possuem limitações pela dificuldade em transpor a barreira hemato-encefálica (BHE). A implantação cerebral de células microencapsuladas superexpressando a enzima de interesse ou o uso de aminoglicosídeos para tradução alternativa de mutações *stop codon* surgem como possíveis alternativas terapêuticas. **Objetivos:** Corrigir a deficiência enzimática *in vitro* através do uso de microcápsulas e de gentamicina, utilizando fibroblastos de pacientes com Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) e Leucodistrofia Metacromática (LDM) para realização dos experimentos. **Materiais e Métodos:** Plasmídeos pRIDUA, contendo o gene da alfa-L-iduronidase (IDUA) ou pTARSA, contendo o gene da arilsulfatase A (ARSA), enzimas deficientes respectivamente, na MPS I e LDM, foram transferidos por lipofecção para a linhagem celular BHK. Clones recombinantes (rBHKs) superexpressando as enzimas foram imobilizados em microesferas de alginato de cálcio. Para a microencapsulação $2,5 \times 10^6$ células/mL foram misturadas a uma solução de alginato de sódio 1,5%. A suspensão celular foi submetida a um fluxo de infusão e ar constantes, de 40 mL/h e 4 L/min, respectivamente. O aparelho perfusor foi acoplado a uma unidade de encapsulação, sobre uma solução de CaCl_2 125mM. As esferas produzidas foram co-cultivadas com os fibroblastos dos pacientes por 45 dias (no caso da MPS I) e 30 dias (para LDM). A atividade enzimática foi medida após 15, 30 e 45 dias (MPS I) e 7, 14, 21 e 28 dias (LDM). Fibroblastos cultivados com cápsulas vazias foram utilizados como controle negativo. Para verificação do efeito da gentamicina, fibroblastos MPS I, heterozigotos para a mutação W402X, foram tratados com gentamicina 200 ug/mL, duas vezes por semana, por 24 horas (n=3) e durante 60 dias (n=4). Os resultados foram expressos em nmol/h/mg proteína. Análise com microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para avaliar a redução do acúmulo lisossomal nos fibroblastos LDM. **Resultados:** Tratamento com a microencapsulação elevou as atividades enzimáticas a níveis normais tanto em fibroblastos LDM quanto em MPS I. Por outro lado, as cápsulas vazias não aumentaram a atividade das enzimas lisossomais. Nos fibroblastos MPS I, o aumento na atividade da enzima foi detectado a partir de 15 dias de co-cultivo. Para a LDM, os valores encontrados foram significativos apenas a partir da 3ª semana de co-cultivo, atingindo seu maior nível após 4 semanas. Análise com MET sugere que após o tratamento, os fibroblastos LDM apresentaram uma discreta diminuição no volume do material acumulado no lisossomo. A atividade da IDUA, em fibroblastos tratados com gentamicina, elevou-se a valores muito mais altos do que os encontrados no grupo cápsulas, sem diferença entre os tempos de tratamento (1 e 60 dias). **Discussão e Conclusão:** O uso *in situ* de células encapsuladas simula a reposição enzimática sem necessidade de injeções repetidas e de transposição da enzima pela BHE. Essa abordagem foi utilizada neste trabalho para tratamento de duas doenças diferentes, e pode ser aplicado a outras deficiências enzimáticas. Da mesma maneira, o uso da gentamicina também surge com uma possível alternativa para outras doenças causadas por mutações tipo *stop codon*. Ambas abordagens podem atingir o SNC, o que faz delas promissoras opções para o tratamento das DL.

Apoio: FIPE-HCPA, CAPES, CNPq- Instituto do Milênio-Rede de Terapia Gênica.