



26^a

Semana Científica
do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
5^a Reunião da Rede Nacional de Pesquisa
Clínica em Hospitais de Ensino
13º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul

Anais

CRIAÇÃO DE UMA SÉRIE DE LENTIVETORES COMO FERRAMENTA PARA TRANSFERÊNCIA GÊNICA ESTÁVEL

JOSÉ EDUARDO VARGAS; ANDRÉS DELGADO CANEDO; GUIDO LENZ

Os vetores lentivirais são amplamente utilizados para realizar protocolos de transferência gênica por serem estáveis e transformar células quiescentes. Embora amplamente utilizados, não existe comercialmente um sistema de lentivetores com expressão gênica regulada por tetraciclina, ou com a possibilidade de uso de diferentes promotores e geração de mRNA bicistrônico com genes repórteres como o GFP ou DsRED. Este trabalho visa a criação de lentivetores retrovirais com uma estrutura plástica que permita clonar diferentes insertos, usar diferentes promotores regulados por tetraciclina e gerar mRNA bicistrônico que permita comprovar a transfecção celular e ao mesmo tempo o nível de expressão do transgene. Para construir estes vetores estão sendo usados cinco plasmídeos comerciais e dois plasmídeos cedidos por pesquisadores da área. O primeiro plasmídeo construído (pLL-msc18) foi gerado substituindo o cassete de expressão do gene GFP do lentivector pLL3.7 pelo sítio de multi-clonagem (mcs) do plasmídeo pUC18. Posteriormente, este plasmídeo foi usado para gerar o plasmídeo pLR1 substituindo o cassete de RNAi pelo promotor RSV e o mcs do plasmídeo pREP9. Assim, obtivemos um plasmídeo com um mcs que contém sete sítios de restrição utilizáveis para clonagem, sob regulação do promotor RSV. A ausência de sítios de reconhecimento das endonucleases necessárias para clonar as seqüências IRES-GFP, IRES-RED e TRE no vetor lentiviral foi resolvida por PCR, com primers específicos contendo os sítios de reconhecimento requeridos, e clonagem no plasmídeo pCR2.1 do sistema TOPO TA. Atualmente aguardamos o resultado do sequenciamento para prosseguir com as clonagens. Desta forma pretendemos gerar um sistema de plasmídeos com expressão regulável contendo ou não o sistema para geração de mRNA bicistrônico com gene repórter, para ser usado como ferramenta para a transferência estável de transgenes, que possam ser utilizados tanto em terapia gênica como em pesquisa básica.