

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas peguiladas visando à terapia gênica  
para a Mucopolissacaridose tipo I**

MICHELLE FRAGA

PORTO ALEGRE, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas peguiladas visando à terapia gênica  
para a Mucopolissacaridose tipo I**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Prof. Dra. Ursula Matte

PORTO ALEGRE, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.08.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Márcia Rosângela Wink

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fraga, Michelle

Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas  
peguiladas visando à terapia gênica para a  
Mucopolissacaridose tipo I / Michelle Fraga. --  
2014.

167 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Coorientadora: Ursula Matte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2014.

1. Nanoemulsões catiônicas. 2. Terapia gênica. 3.  
Mucopolissacaridose tipo I. 4. Plasmídeo pIDUA. 5.  
Polietilenoglicol (PEG). I. Teixeira, Helder  
Ferreira, orient. II. Matte, Ursula, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho àqueles que sempre estiveram ao meu lado: meus pais, Francisco e Dolores, meus irmãos Jonathan e Danielle e meu esposo, Guilherme.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar e me dar forças todos os dias, fazendo com que eu supere todos os obstáculos, alcance todos os meus objetivos e realize todos os meus sonhos.

Aos meus pais Francisco e Dolores, pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão. Amo vocês.

A toda a minha família, especialmente à Danielle e ao Jonathan meus irmãos, pelo companheirismo e ao meu carinhoso esposo Guilherme, pela paciência e apoio em todos os momentos. Amo vocês.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira e Profa. Dra. Ursula Matte, pela oportunidade, confiança e amizade. A parceria é de anos e que assim perdure.

Aos amigos do Centro de Terapia Gênica do HCPA, pela amizade verdadeira, por todos os momentos de distração e pela contribuição científica. Em especial a minha amiga Talita Giacomet de Carvalho, a qual contribuiu diretamente neste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico da UFRGS, por toda a colaboração e amizade. Em especial às minhas amigas Fernanda Bruxel, Dirnete Diel e Juliana Bidone, que participaram ativamente deste trabalho.

Ao Centro de Terapia Gênica do HCPA e ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da UFRGS, que disponibilizaram todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos na elaboração da presente tese.

À Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira da UFMG, e aos Drs. Ângelo Malachias, Carlos A. Perez e Rogério Magalhães-Paniago do LNLS pela colaboração na realização dos experimentos de EDXD.

A CAPES pela bolsa de doutorado e ao FIPE-HCPA, FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença herdada de forma autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), levando ao acúmulo intracelular de heparan e de dermatan sulfato em diversos tecidos. Este estudo teve por objetivo avaliar as potencialidades de nanoemulsões catiônicas peguiladas como um sistema de transferência gênica para o plasmídeo pIDUA em um modelo murino de MPS I. Formulações constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média estabilizado pelo lipídeo catiônico DOTAP e pelos fosfolipídeos DOPE e DPSPE-PEG foram preparadas pelo procedimento de homogeneização à alta pressão. O pIDUA foi associado as nanoemulsões por adsorção ou encapsulamento de complexos pré-formados pIDUA-DOTAP na fase interna das nanoemulsões. A complexação do pIDUA com as nanoestruturas e a sua proteção frente à degradação pela enzima DNase I foi demonstrada através de estudos de retenção em gel de agarose para ambos os modos de complexação. A presença do fosfolipídeo DSPE-PEG nas formulações teve um papel crucial na manutenção do diâmetro dos nanocomplexos na presença de proteínas do soro. Uma maior estabilidade do complexo obtido por encapsulamento foi detectada, uma vez que não foi verificada a liberação do pIDUA a partir destes complexos mesmo após 48 horas de incubação em soro. Uma organização lamelar foi identificada para as nanoemulsões por difração de raios X de energia dispersiva. A associação do pIDUA as formulações por adsorção ou encapsulamento conduz a estruturas menos organizadas. Complexos obtidos na relação de cargas +4/- foram administrados intravenosamente em camundongos nocaute MPS I. Foi demonstrado um aumento da atividade de IDUA (ensaio de fluorescência) e da expressão (RT-qPCR) em diferentes órgãos, em especial no fígado e nos pulmões, em comparação aos camundongos não tratados. A dose e o tempo parecem influenciar a transfecção nos diferentes órgãos avaliados. Não foram detectadas evidências de efeito deletério nos cortes histológicos dos tecidos dos principais órgãos após administração intravenosa dos complexos. O conjunto de resultados demonstra o potencial das nanoemulsões catiônicas contendo DSPE-PEG como um sistema de transferência gênica para MPS I.



## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal disease caused by  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA) deficiency, leading to intracellular accumulation of dermatan and heparan sulfate in different tissues. This study aimed at evaluating the application of PEGylated cationic nanoemulsions complexed with pIDUA as a gene transfer system in a MPS I murine model. Formulations composed of an oil core of medium chain triglycerides stabilized by the cationic lipid DOTAP, and the phospholipids DOPE and DSPE-PEG were prepared by high pressure homogenization procedure. pIDUA was associated to nanoemulsions by adsorption or encapsulation of preformed pIDUA-DOTAP complexes into the inner phase of nanoemulsions. The complexation of pIDUA with nanostructures and its protection against DNase I degradation was demonstrated by the retention of complexes in agarose gel assay for both complexation procedures. The presence of the phospholipid DSPE-PEG plays a crucial role to maintain the narrow size of nanocomplexes in the presence of serum proteins. A higher stability of the complex obtained by encapsulation was detected once it was not detected the release of pIDUA from complexes even after 48 hours of incubation in serum. A lamellar organization was identified for nanoemulsions by energy dispersion X ray. The pIDUA association by adsorption or by encapsulation led to a less organized structures. Complexes obtained at +4/- charge ratio were administered intravenously in MPS I knockout mice. An increase in IDUA activity (fluorescence assay) and expression (RT-qPCR) was detected in different organs, especially in lungs and liver, in comparison with non-treated mice. Dose and time seem to influence the transfection in the evaluated organs. No evidence of deleterious effect was detected in histological analysis of main organ tissues after intravenous administration of such complexes. The overall results show the potential of the cationic nanoemulsions containing DSPE-PEG as a gene transfer system to MPS I.



## LISTA DE FIGURAS

Figure 1.1.	Chemical structure of the most used excipients for nanoemulsion formulations.....	49
Figure 1.2.	Preparation methods of nanoemulsions.....	52
Figure 2.1.	TEM micrographs of blank CNE and CNE complexed with pDNA at the +2/- or +4/- charge ratio. Bars in figure: 0.1 $\mu\text{m}$ .....	94
Figure 2.2.	Migration of complexes formed between CNE and pIDUA in 1% agarose gel. Migration of complexes formed between CNE and pIDUA in 1% agarose gel, after 30 minutes of incubation with DNase I.....	94
Figure 2.3.	Relative mRNA quantification of <i>IDUA</i> by real-time RT-PCR in fibroblasts of one MPS I patient. Results represent the mean $\pm$ standard deviation of three experiments, compared to untreated MPS I mice. Expression ratios are relative to <i>GAPDH</i> endogenous control.....	95
Figure 2.4.	Livers stained with H-E. Untreated MPS I mice, MPS I mice treated with CNE-P/pDNA +4/- through intravenous injection and through intraportal injection. Magnification 200 X.....	96
Figure 3.1.	TEM micrographs of NE, NEP, NE/pIDUA <sub>E</sub> , NE/pIDUA <sub>A</sub> , NEP/pIDUA <sub>E</sub> , NEP/pIDUA <sub>A</sub> and free pDNA at the same concentration as in nanoemulsions and complexes, and magnified droplet of NEP/pIDUA <sub>A</sub> . All complexes were prepared at the charge ratio of +4/-.....	115
Figure 3.2.	Migration of complexes obtained after adsorption or encapsulation of pIDUA into NE and NEP in 1% agarose gel. pDNA: naked pIDUA.....	117
Figure 3.3.	Migration of complexes obtained after adsorption or encapsulation of pIDUA into NE and NEP at charge ratios of +2/- and of +4/- in 1% agarose gel after 30 minutes of incubation with DNase I. pDNA: naked pIDUA.....	117
Figure 3.4.	Release of pIDUA from complexes obtained after adsorption or encapsulation of pIDUA onto NE and NEP at the charge ratios of +2/- and +4/- in 1% agarose gel after 1 hour of incubation with culture medium with or without 10% FBS. pDNA: naked pIDUA.....	118

Figure 3.5.	Release of pIDUA from complexes obtained after adsorption or encapsulation of pIDUA onto NE and NEP at charge ratios of +2/- and of +4/- in 1% agarose gel after 48 hours of incubation with culture medium with or without 10% FBS. pDNA: naked pIDUA.....	118
Figure 3.6.	Physicochemical properties of NE formulations at charge ratios of +2/- and +4/- and of NEP formulations at charge ratios of +2/- and +4/- after incubation with culture medium in the presence of 10% FBS.....	119
Figure 3.7.	Normalized EDXD spectra of blank nanoemulsions NE and NEP, and NE/pIDUA <sub>A</sub> , NEP/pIDUA <sub>A</sub> , NE/pIDUA <sub>E</sub> and NEP/pIDUA <sub>E</sub> complexes, prepared at charge ratios of +4/-.....	120
Figure 3.8.	IDUA activity in the organs of MPS I mice treated with intravenous NEP/pIDUA <sub>A</sub> or NEP/pIDUA <sub>E</sub> at charge ratios of +2/- and of +4/-.....	121
Figure 3.9.	Relative <i>IDUA</i> expression as assessed by RT-qPCR in different organs of MPS I mice treated with intravenous NEP/pIDUA <sub>A</sub> or NEP/pIDUA <sub>E</sub> at the charge ratios of +2/- and of +4/-. Each circle represents one animal. ....	122
Figure 4.1.	Relative expression of IDUA by real-time RT-qPCR in different organs of MPS I mice treated with NEP/pIDUA <sub>A</sub> or NEP/pIDUA <sub>E</sub> . Mice were treated with 30 µg of pIDUA or 60 µg of pIDUA and sacrificed after 2 days or 60 µg of pIDUA and sacrificed after 7 days of intravenous injection. Expression ratios are relative to <i>GAPDH</i> endogenous control.....	144
Figure 4.2.	Representative histological sections stained with H–E of different organs of treated groups (NEP/pIDUA <sub>A</sub> and NEP/pIDUA <sub>E</sub> ) and of negative control (MPS I).....	146

## LISTA DE TABELAS

Table 1.1.	Examples of the composition and the preparation methods of nanoemulsions used as nucleic acids delivery system.....	46
Table 2.1.	Physicochemical properties of CNE and complexes.....	93
Table 2.2.	IDUA activity of CNE/pDNA +4/- complexes after administration by intraportal (IP) or intravenous (IV) routes.....	96
Table 3.1.	Physicochemical properties of the formulations.....	115
Table 4.1.	Physicochemical properties of blank nanoemulsion and complexes.....	142
Table 4.2.	IDUA activity in different organs of MPS I mice treated with NEP/pIDUA <sub>A</sub> or NEP/pIDUA <sub>E</sub> .....	145



## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucleico

DOPE – dioleilfosfatidiletanolamina

DOTAP – 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano

DSPE-PEG – diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol

EDXD – técnica de difração de raios X de energia dispersiva

GFP – green fluorescent protein– proteína verde fluorescente

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MCT – medium chain triglycerides – triglicerídeos de cadeia média

MPS I – mucopolissacaridose tipo I

PCR – polymerase chain reaction–reação em cadeia da polimerase

pDNA – plasmídeo

PEG – polietilenoglicol

pIDUA – plasmídeo que codifica para a enzima alfa -L-iduronidase

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real

TEM – transmission electron microscopy – microscopia eletrônica de transmissão



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO I</b> .....	39
Introduction.....	44
Formulation Issues .....	45
Composition .....	45
Preparation methods.....	51
Physicochemical Issues.....	54
Droplet size and distribution .....	54
Surface charge .....	56
Complexes formation.....	58
Nucleic acids descomplexation from nanoemulsions .....	60
Morphological and structural organization of complexes .....	62
Biological Issues .....	64
Stability against nuclease degradation .....	64
Cytotoxicity.....	65
<i>In vitro</i> gene transfer .....	67
<i>In vivo</i> biodistribution .....	70
<i>In vivo</i> gene transfer.....	72
Conclusion .....	74
Abreviation list.....	75
References .....	76
<b>CAPÍTULO II</b> .....	83
Introduction.....	88
Materials and Methods.....	89
Construction of pIDUA.....	89
Preparation of cationic nanoemulsions and complexes .....	89
Characterization of complexes.....	90
Stability assay.....	90
<i>In vitro</i> assay.....	91
<i>In vivo</i> assay.....	92

IDUA activity.....	92
Ethics.....	92
Statistics.....	93
Results.....	93
Characterization of complexes.....	93
Retention and stability assay.....	94
<i>In vitro</i> assay.....	95
<i>In vivo</i> assay.....	95
Discussion.....	96
Conclusion.....	99
References.....	100
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>103</b>
Introduction.....	108
Materials and Methods.....	109
Construction of pIDUA.....	109
Preparation of formulations .....	110
Droplet size and zeta potential .....	111
Transmission electron microscopy.....	111
Agarose gel eletrophoresis.....	112
Energy dispersive X-ray diffraction (EDXD).....	112
<i>In vivo</i> experiments.....	113
Ethics.....	114
Statistical analysis.....	115
Results.....	115
Physicochemical properties of the formulations.....	115
Loading and stability of pIDUA complexes.....	117
Decomplexation of pIDUA.....	118
Structural organization.....	119
pIDUA activity.....	120
IDUA gene expression.....	122
Discussion.....	123
Conclusion.....	127
References.....	129

<b>CAPÍTULO IV</b> .....	133
Introduction.....	138
Materials and Methods.....	139
Materials.....	139
Preparation of PEGylated cationic nanoemulsions.....	139
Preparation of pIDUA/PEGylated cationic nanoemulsion complexes .....	140
Physicochemical characterization .....	140
<i>In vivo</i> experiments.....	140
Histological analysis.....	141
Ethics.....	141
Statistics.....	142
Results and Discussion.....	142
Conclusion.....	146
References.....	148
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	151
<b>CONCLUSÕES</b> .....	165



## INTRODUÇÃO

---



As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças hereditárias causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas necessárias à degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). O acúmulo lisossômico de GAGs resulta em disfunções nas células, tecidos e órgãos (MARTINS, et al., 2009; NEUFELD e MUENZER, 2001). Dependendo da deficiência enzimática, o metabolismo de dermatan, heparan e queratan sulfato, de condroitina ou do ácido hialurônico pode ser bloqueado isoladamente ou em combinação. Há onze deficiências enzimáticas conhecidas que levam às sete distintas MPS. Este grupo de doenças apresenta um amplo espectro de severidade clínica, inclusive para uma mesma deficiência enzimática (GIUGLIANI, 2012).

Os GAGs são componentes da matriz extracelular com exceção do ácido hialurônico, covalentemente ligados a uma matriz protéica específica, formando um grupo diverso de macromoléculas denominadas proteoglicanos. Esta estrutura confere elasticidade aos tecidos e capacita-os a manter sua conformação característica. Existe um contínuo *turn-over* celular de proteoglicanos, porém pouco se sabe sobre a regulação deste processo, mas o sistema lisossômico é claramente um integrante da homeostase da matriz extracelular (WINCHESTER, 1996). O acúmulo dos GAGs nos tecidos causa diretamente algumas das manifestações clínicas das MPS, tais como face grosseira, visceromegalia e espessamento cutâneo. Outras manifestações clínicas, como deficiência mental e o retardo do crescimento, são resultados de alteração da função celular que o acúmulo de GAGs provoca. Por fim, os GAGs podem interferir diretamente na estrutura de substâncias como o colágeno, levando a sintomas de contratura articular (MARTINS et al., 2009).

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é considerada o protótipo da doença de depósito lisossômico progressiva multisistêmica. É uma doença herdada de forma autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76). A IDUA é uma proteína de 653 aminoácidos, possuindo um tamanho inicial de 73 KDa, a qual é processada a uma forma madura de 69 KDa. Esta enzima é uma glicosidase, cuja função é a hidrólise de resíduos ácidos  $\alpha$ -L-idurônicos dos GAGs

heparan e dermatan sulfato, sendo que estes se acumulam intracelularmente na sua deficiência (MARTINS et al., 2009).

As manifestações clínicas são heterogêneas sendo reconhecidas três formas principais: MPS IH ou Síndrome de Hurler (forma grave), MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária) e MPS IS ou Síndrome de Scheie (forma atenuada). A expectativa de vida é limitada à infância na forma MPS IH e à adolescência na forma intermediária, na forma mais leve a expectativa de vida do paciente pode ser normal (MARTINS et al., 2009; NEUFELD e MUENZER, 2001).

Uma das abordagens terapêuticas para o tratamento da MPS I é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Este procedimento tem sido empregado como um tratamento para a síndrome de Hurler (HOBBS et al., 1981). A expectativa de vida dos pacientes é aumentada e muitas das anormalidades sistêmicas melhoraram após o transplante (EISENGART et al., 2013; HUGH-JONES et al., 1989). Quanto à função neurológica, estudos indicam que as alterações presentes pré-transplante parecem ser irreversíveis e a deterioração mental torna-se apenas mais lenta (SHAPIRO et al., 2012). Em relação às desordens músculo-esqueléticas na síndrome de Hurler, o TCTH não parece alterar a história natural da doença, sugerindo dificuldade de acesso da enzima a esses órgãos (WEISSTEIN et al., 2004). Além disso, TCTH apresenta alta morbidade e mortalidade associadas, além da necessidade de encontrar um doador compatível (BONFIM et al., 2007).

A terapia de reposição enzimática (TRE) tem sido mais recentemente utilizada com sucesso, a qual consiste na administração direta da enzima no paciente. Esta terapia foi recomendada inicialmente para pacientes com Síndrome de Hurler-Scheie e Scheie, apesar de já existirem estudos promissores mostrando melhoras clínicas em pacientes com a forma grave da doença (GIUGILANI et al., 2009; WRAITH et al., 2007). Apesar da TRE ser a terapêutica atual mais segura, essa abordagem possui uma série de limitações, incluindo o fato da enzima administrada não chegar a órgãos de difícil acesso, como cérebro, ossos e cartilagem (PASTORES et al., 2007). Ainda, o

fato da administração da enzima ser realizada semanalmente e o elevado custo dessa terapia justifica a busca de novas estratégias para o tratamento da MPS I.

Assim, até o momento, não há um tratamento eficaz e curativo para todas as manifestações clínicas da doença, limitando-se a medidas gerais de suporte. Tal fato tem impulsionado a busca por novas alternativas para o tratamento da doença, como a terapia gênica. A terapia gênica consiste na inserção de um gene funcional para corrigir uma disfunção celular ou para prover novas funções às mesmas (COTRIM e BAUM, 2008). A aplicação da terapia gênica para as doenças lisossômicas de depósito tem sido considerada como uma estratégia promissora, uma vez que estas são causadas por deficiências em genes únicos e uma atividade enzimática 10-20% dos níveis normais tem eficácia clínica (BECK, 2010). Os primeiros estudos relativos à terapia gênica para MPS I já foram escritos na literatura (CAMASSOLA et al, 2005; CHUNG et al., 2007; JANSON et al., 2014; METCALF et al., 2010; VISIGALLI et al., 2010).

Contudo, apesar dos resultados obtidos, a reduzida penetração intracelular dos ácidos nucléicos limita a eficiência de transfecção. O elevado peso molecular e o caráter polianiônico limitam o seu transporte intracelular em decorrência da repulsão eletrostática com as membranas celulares. Após a penetração, a mobilidade dos ácidos nucléicos é restrita devido a diversos fatores, como a presença de agregados moleculares, obstáculos citoplasmáticos imóveis e a associação dos mesmos com proteínas citosólicas (LECHARDEUR et al., 2005; WAGNER et al., 2004). Além disso, a instabilidade dos ácidos nucléicos em fluídos biológicos devido à rápida degradação frente ao ataque enzimático limita o uso destas moléculas *in vivo* (CAMPBELL et al., 2001; LECHARDEUR et al., 2005).

A fim de contornar essas limitações, a inserção do gene de interesse intracelularmente ocorre geralmente através do uso de vetores, sendo que estes podem ser de natureza viral ou não viral (NARDI et al., 2002; NATHWANI et al., 2004). Os vetores virais têm sido empregados para atingir expressão gênica eficiente, porém problemas relacionados à segurança no seu uso, bem como a resposta imune gerada, têm limitado seu uso (BARCIA et al., 2007; COTRIM e BAUM, 2008; DEISHMANN

et al., 2007). Assim sendo, vetores não virais têm se tornado uma opção promissora, justamente pelo fato de serem mais seguros, estáveis, fáceis de produzir e simples de manipular (LIU e YU, 2010; FRAGA et al., 2011; KOWN et al., 2008).

Dentre os vetores não virais, correntemente descritos na literatura, encontram-se os lipossomas (KARMALI e CHAUDHURI, 2007), as nanopartículas lipídicas (PEDERSEN et al., 2006) e as nanoemulsões (NAM et al., 2009). Lipossomas catiônicos podem ser definidos como dispersões aquosas de uma mistura binária de um fosfolipídeo e de um lipídeo catiônico organizadas na forma de bicamadas concêntricas, enquanto nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões são constituídas por um núcleo lipídico sólido ou líquido estabilizado pela presença de tensoativos. Independente da nanoestrutura formada, os sistemas lipídicos contêm um lipídeo catiônico (geralmente aminas primárias e quaternárias) que formam um par iônico (complexo) com os grupamentos fosfato dos ácidos nucléicos.

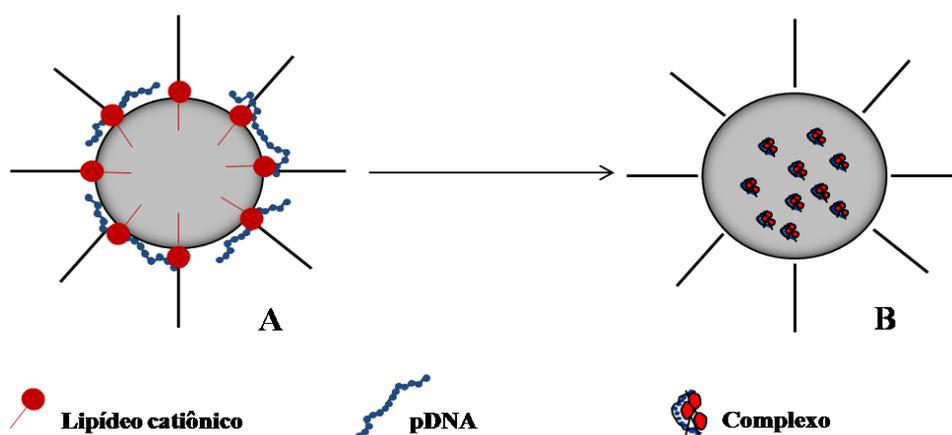
Diversos fatores podem influenciar as propriedades físico-químicas das nanoestruturas lipídicas, incluindo a composição qualitativa e quantitativa, a técnica de preparação e a relação de cargas entre os grupamentos carregados positivamente e negativamente dos lipídeos catiônicos e ácidos nucléicos. A literatura descreve estudos visando à otimização dos complexos, especialmente em relação ao diâmetro médio e carga de superfície (KARMALI e CHAUDHURI, 2007; NAM et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado um aumento da eficiência de transfecção utilizando-se esses complexos (CHANG et al., 2004; CHOI et al., 2004; MIN et al., 2005; TU e KIM, 2010).

Recentemente, demonstramos o efeito de diferentes fosfolipídeos sobre as propriedades de complexos formados entre nanoemulsões e um plasmídeo modelo, o pTracer<sup>TM</sup>-CMV2 (FRAGA et al., 2008a; 2008b; 2011). Os resultados demonstraram o efeito da relação de cargas sobre a complexação e a proteção do pDNA complexado frente à degradação da DNase I. A composição das formulações influenciou a toxicidade e a eficiência de transfecção frente a células Hep G2 *in vitro*. A toxicidade dos complexos formados foi relacionada com a presença do lipídeo catiônico

estearilamina e com a temperatura de transição de fases dos fosfolipídeos empregados. Foi possível demonstrar uma maior eficiência de transfecção das nanoemulsões catiônicas em células Hep G2, através do uso da técnica de PCR em tempo real.

Contudo, as aplicações *in vivo* de complexos catiônicos apresentam limitações relacionadas à sua estabilidade na presença de proteínas plasmáticas e uma limitada biodistribuição, influenciada pela rápida captura dos complexos pelo sistema fagocitário mononuclear. A fim de contornar esses inconvenientes, estudos recentes têm demonstrado o efeito da adição de fosfolipídeos ligados a polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol, sobre a estabilidade e aumento do tempo de circulação dos complexos formados (AMBEGIA et al., 2005; MORILLE et al., 2008). Tais achados têm sido relacionados com um aumento da eficiência de transfecção em diferentes órgãos após administração intravenosa (AMBEGIA et al., 2005; HU et al., 2010).

Apesar dos avanços, pelo menos no que se refere ao uso de carreadores catiônicos para contornar a baixa penetração intracelular e degradação enzimática dos ácidos nucleicos, a busca por novas estratégias para a sua administração intravenosa permanece como um grande desafio. O presente estudo investigou o efeito da adição de um fosfolipídeo ligado ao polietileno glicol (DSPE-PEG) em nanoemulsões catiônicas e do modo de incorporação do plasmídeo pIDUA (por adsorção ou encapsulamento de complexos pré-formados) sobre propriedades físico-químicas, organização estrutural e eficiência de transfecção em um modelo murino de MPS I. A figura abaixo apresenta as duas estratégias de associação do plasmídeo pIDUA às nanoemulsões: adsorção (A) ou encapsulamento de complexos pré-formados (B).





## **OBJETIVOS**

---



## **OBJETIVO GERAL**

Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas peguiladas contendo o plasmídeo pIDUA incorporado por adsorção ou encapsulamento como sistema de transferência gênica para o modelo murino de MPS I.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar, caracterizar as propriedades físico-químicas, a liberação e a organização estrutural de nanoemulsões catiônicas contendo o fosfolípídeo DSPE-PEG antes e após a adsorção ou encapsulamento do plasmídeo pIDUA.
- Avaliar *in vitro* a eficiência de transfecção dos sistemas desenvolvidos em fibroblastos de paciente MPS I.
- Investigar *in vivo* através de diferentes protocolos de dose e tempo a eficiência de transfecção dos sistemas desenvolvidos em modelo animal murino para MPS I, após administração por via intravenosa e intraportal.
- Avaliar a possível toxicidade dos complexos nos principais órgãos através de análise histológica.



## REFERÊNCIAS

- AMBEGIA, E., ANSELL, S., CULLIS, P., HEYES, J., PALMER, L., MACLACHLAN, I. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v.1669, n.2, p.155-63. 2005.
- BARCIA, C., GERDES, C., XIONG, W. D., THOMAS, C. E., LIU, C., KROEGER, K. M., CASTRO, M. G., LOWENSTEIN, P. R. Immunological thresholds in neurological gene therapy: highly efficient elimination of transduced cells might be related to the specific formation of immunological synapses between T cells and virus-infected brain cells. **Neuron Glia Biol**, v.13, n.2, p.309-322. 2007.
- BECK, M. Therapy for lysosomal storage disorders. **IUBMB Life**, v.62, p.33-40. 2010.
- BONFIM, C., KOLISKI, A., BITENCOURT, M., SETUBAL, D., FUNKE, V., RUIZ, J., COUTINHO, E., OLIVEIRA, M., MEDEIROS, L., ZANIS-NETO, J., MEDEIROS, C. R., CAT, I., PASQUINI, R. Stem cell Transplantation for inborn errors of metabolism: a single center experience in 20 patients. **Acta Bioquím Clin Latinoam**, v.1, p.52. 2007.
- CAMASSOLA, M., BRAGA, L. M., DELGADO-CAÑEDO, A., DALBERTO, T. P., MATTE, U., BURIN, M., GIUGLIANI, R., NARDI, N.B. Nonviral *in vivo* gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. **J Inherit Metab Dis**, v.28, n.6, p.1035-1043. 2005.
- CAMPBELL, R. B., BALASUBRAMANIAN, S. V., STRAUBINGER, R. M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. **Bioch Biophys Acta**, v.1512, p.27-39. 2001.
- CHANG, F. H., LEE, C. H., CHEN, M. T., KUO, C. C., CHIANG, Y. L., HANG, C. Y., ROFFLER, S. Surfection: a new platform for transfected cell arrays. **Nucleic Acids Res**, v.32, p.32-33. 2004.
- CHOI, W. J., KIM, J. K., CHOI, S. H., PARK, J. S., AHN, W. S. and KIM, C. K. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. **Biomaterials**, v.25, n.27, p.5893-5903. 2004.
- CHUNG, S., MA, X., LIU, Y., LEE, D., TITTIGER, M., PONDER, K. P. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alpha-L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. **Mol Genet Metab**, v.90, n.2, p.181-192. 2007.

COTRIM, A. P., BAUM, B. J. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. **Toxicol Pathol**, v.36, n.1, p.97-103. 2008.

DEISHMANN, A., HACEIN-BEY-ABINA, S., SCHMIDT, M., GARRIGUE, A., BRUGMAN, M. H., HU, J., GLIMM, H., GYAPAY, G., PRUM, B., FRASER, C.C., FISCHER, N., SCHWARZWAELDER, K., SIEGLER, M. L., DE RIDDER, D., PIKE-OVERZET, K., HOWE, S. J., THRASHER, A. J., WAGEMAKER, G., ABEL, U., STAAL, F. J., DELABESSE, E., VILLEVAL, J. L., ARONOW, B., HUE, C., PRINZ, C., WISSLER, M., KLANKE, C., WEISSENBACH, J., ALEXANDER, I., FISCHER, A., VON KALLE, C., CAVAZZANA-CALVO, M. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. **J Clin Invest**, v.117, n.8, p.2225-2232. 2007.

EISENGART, J. B., RUDSER, K. D., TOLAR, J., ORCHARD, P. J., KIVISTO, T., ZIEGLER, R. S., WHITLEY, C. B., SHAPIRO, E. G. Enzyme replacement is associated with better cognitive outcomes after transplant in Hurler syndrome. **J Pediatr**, v.16, n.2, p.375-380. 2013.

FRAGA, M., LAUX, M., SANTOS, G. R., ZANDONA, B., GIUBERTI, C. S., OLIVEIRA, M., C., MATTE, U. and TEIXEIRA, H. F. Optimization of stearylamine-based NE obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. **J Drug Del Sci Tech**, v.18, n.6, p.398-403. 2008a.

FRAGA, M., LAUX, M., DOS SANTOS, G. R., ZANDONA, B., DOS SANTOS GIUBERTI, C., DE OLIVEIRA, M. C., DA SILVEIRA, M. U. and TEIXEIRA, H. F. Evaluation of the toxicity of oligonucleotide/cationic NE complexes on Hep G2 cells through MTT assay. **Pharmazie**, v.63, n.9, p.667-670. 2008b.

FRAGA, M., BRUXEL, F., LAGRANHA, V. L., TEIXEIRA, H. F. and MATTE, U. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. **Int J Nanomedicine**, v.6, p.2213-2220. 2011.

GIUGLIANI, R., ROJAS, V. M., MARTINS, A. M., VALADARES, E. R., CLARKE, J. T., GÓES, J. E., KAKKIS, E. D., WORDEN, M. A., SIDMAN, M., COX, G. F. A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. **Mol Genet Metab**. v.96, p.13–19. 2009.

GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genet Mol Biol**, v.35, (4 suppl), p.924-931. 2012.

HOBBS, J. R., BARRET, A. J., CHAMBERS, D., JAMES, D., HUGH-JONES, K., BYROM, N., HENRY, K., LUCAS, C., BENSON, B., TANSLEY, L., PATRICK, A., MOSSMAN, J., YOUNG, E. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. **Lancet**, v.2, p.709-712. 1981.

HU, Y., LI, K., WANG, L., YIN, S., ZHANG, Z., ZHANG, Y. Pegylated immuno-lipopolyplexes: A novel non-viral gene delivery system for liver cancer therapy. **J Control Release**, v.144, p.75-81. 2010.

HUGH-JONES, K., HOBBS, J. R., VELLODI, A., et al. Long-term follow-up of children with Hurler's disease treated with bone marrow transplantation. In: HOBBS, J. R. (ed.) **Correction of certain genetic diseases by transplantation**. London: COGENT, p.103-111. 1989.

JANSON, C. G., ROMANOVA, L. G., LEONE, P., NAN, Z., BELUR, L., MCIVOR, R. S., LOW, W. Comparison of Endovascular and Intraventricular Gene Therapy with AAV5-IDUA for Hurler's Disease. **Neurosurgery**, v.74, n.1, p.99-111. 2014.

KARMALI, P. P., CHAUDHURI, A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. **Med Res Rev**, v.27, n.5, p.696-722. 2007.

KWON, S. M., NAM, H. Y., NAM, T., PARK, K., LEE, S., KIM, K., KWON, I. C., KIM, J., KANG, D., PARK, J. H. and JEONG, S. Y. *In vivo* time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. **J Control Release**, v.128, n.1, p.89-97. 2008.

LECHARDEUR, D., VERKMAN, A. S., LUKACS, G. L. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. **Adv Drug Del Rev**, v.57, p.755-767. 2005.

LIU, C. H., YU, S. Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.79, n.2, p.509-515. 2010.

MARTINS, A. M., DUALIBI, A. P., NORATO, D., TAKATA, E. T., SANTOS, E. S., VALADARES, E. R., PORTA, G., DE LUCA, G., MOREIRA, G., PIMENTEL, H., COELHO, J., BRUM, J. M., SEMIONATO-FILHO, J., KERS TENETZKY, M. S., GUIMARÃES, M. R., ROJAS, M. V., ARANDA, P. C., PIRES, R. F., FARIA, R. G., MOTA, R. M., MATTE, U., GUEDES, Z. C. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **J Pediatr**, v.155, p.S32-S46. 2009.

METCALF, J. A., MA, X., LINDERS, B., WU, S., SCHAMBACH, A., OHLEMILLER, K. K., KOVACS, A., BIGG, M., HE, L., TOLLEFSEN, D. M., PONDER, K. P. A self-inactivating gamma-retroviral vector reduces manifestations of mucopolysaccharidosis I in mice. **Mol Ther**, v.18, n.2, p.334-342. 2010.

MIN, K. A., LEE, S. K. and KIM, C. K. Improved gene expression pattern using Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid and cationic emulsion. **Biomaterials**, v.26, n.9, p.1063-1070. 2005.

MORILLE, M., PASSIRANI, C., VONARBOURG, A., CLAVREUL, A., BENOIT, J. P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. **Biomaterials**, v.2, n.24-25, p.3477-3496. 2008.

NAM, H. Y., PARK, J. H., KIM, K., KWON, I. C., JEONG, S. Y. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. **Arch Pharm Res**, v.3, n.5, p.639-646. 2009.

NARDI, N. B., TEIXEIRA, L. A. K., SILVA, E. F. A. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.1, p.109-116. 2002.

NATHWANI, A. C., BENJAMIN, R., NIENHUIS, A. W., DAVIDOF, A.M. Current status and prospects for gene therapy. **Vox Sanguinis**, v.87, p.73-81. 2004.

NEUFELD, E. F., MUENZER, J. The Mucopolysaccharidosis. In: SCRIVER, C. R., BEAUDET, A. L., SLY, W. S., VALLE, D. (ed.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th Edition. New York: McGraw-Hill, p.3421-3452. 2001.

PASTORES, G. M., ARN, P., BECK, M., CLARKE, J. T., GUFFON, N., KAPLAN, P., MUENZER, J., NORATO, D. Y., SHAPIRO, E., THOMAS, J., VISKOCHIL, D., WRAITH, J. E. The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with mucopolysaccharidosis Type I. **Mol Genet Metab**, v.91, n.1, p.37-47. 2007.

PEDERSEN, N., HANSEN, S, HEYDENREICH A.V., KRISTENSEN H.G., POULSEN H.S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. **Eur J Pharm Biopharm**. V. 62, p. 155-162, 2006.

SHAPIRO, E., GULER, O. E., RUDSER, K., DELANEY, K., BJORAKER, K., WHITLEY, C., TOLAR, J., ORCHARD, P., PROVENZALE, J., THOMAS, K. M. An exploratory study of brain function and structure in mucopolysaccharidosis type I: long term observations following hematopoietic cell transplantation (HCT). **Mol Genet Metab**, v.107, n.1-2, p.116-121. 2012.

TEIXEIRA, H., DUBERNET, C., ROSILIO, V., LAIGLE, A., DEVERRE, J. R., SCHERMAN, D., BENITA, S. and COUVREUR, P. Factors influencing the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. **J Control Release**, v.70, n.1-2, p.243-255. 2001.

TU, Y., KIM, J. S. Selective Gene Transfer to Hepatocellular carcinoma Using Homing Peptide-Grafted Cationic Liposomes. **J Microbiol Biotechnol**, v.20, n.4, p.821-827. 2010.

VISIGALLI, I., DELAI, S., POLITI, L. S., DI DOMENICO, C., CERRI, F., MRAK, E., D'ISA, R., UNGARO, D., STOK, M., SANVITO, F., MARIANI, E., STASZEWSKY, L., GODI, C., RUSSO, I., CECERE, F., DEL CARRO, U., RUBINACCI, A., BRAMBILLA, R., QUATTRINI, A., DI NATALE, P., PONDER, K., NALDINI, L., BIFFI, A. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. **Blood**, v.116, n.24, p.5130-5139. 2010.

WAGNER, E., KIRCHEIS, R., WALKER, G. F. Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. **Biomed & Pharmacoth**, v.58, p.152-161. 2004.

WEISSTEIN, J. S., DELGADO, E., STEINBACH, L. S., HART, K., PACKMAN, S. Musculoskeletal Manifestations of Hurler Syndrome. **J Pediatr Orthop**, v.24, p.97-101. 2004.

WINCHESTER, B. Lysosomal Metabolism of Glycoconjugates. In: LLOYD & MASON (ed.). **Subcellular Biochemistry: Biology of the Lysosome**. New York: Plenum Press, v. 27, p.191-238. 1996.

WRAITH, J. E., BECK, M., LANE, R., VAN DER PLOEG, A., SHAPIRO, E., XUE, Y., KAKKIS, E. D., GUFFON, N. Enzyme Replacement Therapy in Patients who have Mucopolysaccharidosis I and are younger than 5 years: Results of a multinational study of recombinant human  $\alpha$ -L-Iduronidase (Laronidase). **Pediatrics**, v.120, p.37-46. 2007.



































































































































































































































**DISCUSSÃO GERAL**

---



A Mucopolissacaridose tipo I é uma doença autossômica recessiva de depósito lisossomal causada por mutações no gene da  $\alpha$ -L-iduronidase. A deficiência desta enzima causa o acúmulo de seus substratos, os glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato (MARTINS et al., 2009). A incidência de MPSI no Brasil não é conhecida, entretanto, uma análise de dados de pacientes com MPS I, coletados pela Sociedade de Mucopolissacaridose, no Reino Unido, encontrou uma prevalência de 1,07 para cada 100.000 nascimentos (MARTINS et al., 2009; MOORE et al., 2008).

Os tratamentos disponíveis para a MPS I são o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE), ambos com efeitos limitados devido a diferentes fatores. O TCTH apresenta alta morbidade e mortalidade associadas, além de que há necessidade de se encontrar um doador compatível (BONFIM et al., 2007). A TRE não é capaz de corrigir os sintomas neurológicos, porque a enzima é administrada em nível sistêmico e esta não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (PASTORES et al., 2007). Estes obstáculos incentivam a pesquisa de novos tratamentos para MPS I, como a terapia gênica (CHUNG et al., 2007; TRAAS et al., 2007).

Na terapia gênica a inserção do gene de interesse ocorre através da utilização de vetores, sendo que estes podem ser virais ou não-virais. Os vetores virais são extremamente eficientes quanto à transferência gênica, mas oferecem menor segurança devido à possibilidade de ocorrer mutações insercionais, principalmente no caso dos retrovírus (COTRIM e BAUM, 2008; DEISHMANN et al., 2007). Os vetores não-virais são considerados mais seguros, pois geralmente não há sua integração no genoma da célula, além de serem mais estáveis e fáceis de produzir (KOWN et al., 2008; LIU e YU, 2010). Entre esses, encontram-se os lipossomas (KARMALI e CHAUDHURI, 2007), as nanopartículas lipídicas sólidas (BONDÌ e CRAPARO, 2010) e as nanoemulsões (NAM et al., 2009). Tais sistemas contêm pelo menos um composto catiônico (lipídeo, tensoativo ou aminoácido) na sua formulação que permite a associação dos ácidos nucléicos com a nanoestrutura através de interações eletrostáticas com os grupamentos fosfato.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, descrevemos a complexação de um gene repórter (GFP) com nanoemulsões catiônicas tipo O/A (FRAGA et al, 2008; 2011). Estes complexos demonstraram proteger o ácido nucléico frente à digestão pela DNase I, reduzida toxicidade e uma significativa eficiência de transfecção em células Hep G2. Estes resultados interessantes nos levaram a investigar, no presente estudo, o potencial de tais sistemas como sistemas de liberação para o plasmídeo pIDUA em um modelo murino de mucopolissacaridose tipo I.

Partindo-se de uma formulação descrita em nossos estudos anteriores (TCM, DOPE e DOTAP), na primeira etapa deste estudo, investigamos a viabilidade de incorporação de fosfolipídeos ligados a polímeros hidrofílicos a essas formulações. O uso de DSPE-PEG tem sido relacionado com um aumento do tempo de circulação de sistemas nanoestruturados decorrente de uma redução da cinética de adsorção de proteínas e captura pelo sistema fagocítico mononuclear (HU et al., 2010; KIM et al., 2003). Os resultados demonstraram uma redução do potencial- $\zeta$  das nanoemulsões, em comparação com as formulações controle, sugerindo a localização deste na interface óleo/água (capítulo II). A associação do pIDUA conduz a um aumento do diâmetro das gotículas e uma inversão do potencial- $\zeta$ . A carga de superfície negativa, mesmo em relação de cargas positivas (+4/- e +2/-), o que foi relacionado com a presença do DSPE-PEG ancorado na interface e com o elevado peso molecular do pIDUA (12,8 Kb), embora frequentemente uma relação de cargas teórica positiva leva a formação de complexos carregados positivamente (FRAGA et al., 2011; KWON et al., 2008).

A adição do fosfolipídeo DSPE-PEG nas formulações influenciou de maneira marcante a estabilidade das nanoemulsões e complexos formados com o pIDUA na presença de proteínas do soro (capítulo III). Os experimentos realizados em comparação com formulações obtidas sem esse fosfolipídeo demonstraram valores de IP próximos a 1 e tamanhos de gotículas micrométricos. Tais resultados foram relacionados com a proteção estérica conferida pelas cadeias de PEG, que evitam desta maneira a agregação das gotículas e assim a desestabilização dos complexos (HU et al., 2010; KIM et al., 2003).

Independentemente da composição, a formação de complexos do pIDUA com nanoemulsões catiônicas foi evidenciada, uma vez que o plasmídeo livre não foi visualizado no ensaio de retenção de gel de agarose, a medida que aumentou-se a concentração da nanoemulsão. A partir da relação de cargas +2/- as bandas do plasmídeo ficaram completamente retidas no ponto de aplicação. Interações eletrostáticas entre os grupamentos carregados positivamente dos lipídeos catiônicos e os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos carregados negativamente têm sido consideradas como a força principal na complexação de polinucleotídeos na interface O/A das nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001a, b; TRIMAILLE et al., 2003; HAGIGIT et al., 2008). Essas interações foram suficientes para evitar a degradação do pIDUA pela enzima DNase I, uma vez que foram detectadas bandas características de pIDUA intacto após incubação dos complexos com a enzima, de acordo com achados na literatura (BARUT et al., 2005; FRAGA et al., 2011).

Para a avaliação da eficiência de transfecção *in vitro* foi realizada a quantificação do mRNA de IDUA por PCR em tempo real, em fibroblastos tratados e não tratados de um paciente MPS I (capítulo II). Um fator importante que contribui para a transfecção do complexo NE/pDNA é a relação de cargas (LIU et al., 1996). Mesmo os complexos apresentando um potencial- $\zeta$  negativo, a maior eficiência foi obtida para os complexos obtidos em uma relação de cargas teórica +4/-. Além da estabilidade dos complexos, devido à adição de DSPE-PEG, os resultados de transfecção podem ser relacionados com a presença de DOPE nas formulações. A literatura descreve que o fosfolipídeo DOPE desempenha um papel semelhante em emulsões como em lipossomas catiônicos. Alguns estudos têm sugerido que os complexos nanoemulsão catiônica/DNA penetram nas células via endocitose, sendo necessário o escape para o citosol. Neste caso, a DOPE auxiliaria o complexo a interagir e se fundir com a membrana endossomal, resultando no aumento da eficiência de transfecção (HARA et al., 1997b; HU et al., 2010; HUNG et al., 2005).

Este mesmo complexo que apresentou melhor eficiência de transfecção *in vitro* foi avaliado *in vivo* através de injeção intravenosa na veia da cauda de camundongos nocaute MPS I, sendo utilizados estes camundongos não tratados como controles. O

resultado foi representado em relação à quantidade de enzima IDUA produzida nos diferentes órgãos. Foi observado aumento significativo de atividade IDUA no pulmão e no fígado, de acordo com relatos prévios da literatura em outros modelos (KANG et al., 2009; KIM et al., 2000, 2001). A fim de melhorar a transfecção no fígado foi realizada uma administração local através da via intraportal, uma vez que foi relatado que a administração por esta via possui transferência gênica superior para o fígado quando comparada a administração sistêmica (HARA et al., 1997a; CHOI et al., 2002). No entanto, contrariamente a nossa expectativa, não observamos uma melhora significativa da eficiência de transfecção com pIDUA no fígado, apenas uma tendência. Porém este pequeno aumento pode ser clinicamente relevante já que corresponde a valores encontrados em pacientes com a forma atenuada da doença.

A partir destes resultados, em uma segunda etapa, investigamos o efeito do modo de incorporação do plasmídeo pIDUA sobre as propriedades físico-químicas, a velocidade de liberação, a organização estrutural dos complexos, bem como sobre a atividade e expressão de *IDUA* em um modelo murino de MPS I (capítulo III). O pIDUA foi associado às formulações por adsorção ou por encapsulamento a partir de complexos pré-formados com o lipídeo catiônico DOTAP, em etapa prévia à obtenção das formulações por homogeneização à alta pressão. Assim como na primeira etapa, a complexação do pIDUA foi comprovada através da retenção dos complexos em ensaio de gel de agarose e a proteção do pIDUA da digestão pela enzima DNase I também foi evidenciada. Entretanto, as formulações obtidas por adsorção tiveram o pIDUA rapidamente liberado corroborando com relato prévio na literatura, no qual observou-se uma liberação rápida de polinucleotídeos adsorvidos na interface O/A de nanoemulsões, especialmente na presença de proteínas presentes no soro fetal bovino (TEIXEIRA et al., 2001a). No entanto, quando os complexos obtidos com pIDUA encapsulado foram diluídos nas mesmas condições experimentais, não houve detecção de bandas características de plasmídeo livre mesmo após 48 horas de incubação. De fato, este resultado sugere que a internalização de pIDUA (pelo menos parcialmente, se considerarmos os nossos resultados de potencial zeta) pode desempenhar um papel na liberação do plasmídeo a partir dos complexos.

Estudos de Raios X de energia dispersiva (EDXD) foram realizados com o objetivo de compreender a organização dos complexos obtidos por adsorção ou por encapsulamento (capítulo III). As nanoemulsões apresentaram uma organização lamelar, o que também foi observado para outras formulações contendo lecitina de gema de ovo/DOTAP (BRUXEL et al., 2013) ou fosfatidilcolina/colesterol/DOTAP (CHESNOY et al., 2001). Contudo, a estrutura lamelar não foi mais observada para os complexos obtidos por adsorção ou por encapsulamento do pIDUA. A presença de DSPE-PEG nas nanoemulsões NEP e nos complexos NEP/pIDUA<sub>A</sub> é percebida no difratograma pelo aumento do tamanho do retículo em cerca de 40 Å, sugerindo assim a inserção de DSPE-PEG na organização lipídica. Uma espessura de 40 Å para revestimento delipossomas por PEG2000 tem sido descrita na literatura, determinada através de perfil de densidade eletrônica, calculada a partir de dados de SAXS (VARGA et al., 2012).

Apesar da organização estrutural dos complexos não ter sido detectada por esta técnica, picos sugerindo a presença do DNA adsorvido às nanoemulsões NE e NEP foram observados em  $q = 0,119 \text{ \AA}^{-1}$  (53 Å, Figura 3.7C) e  $q = 0,126 \text{ \AA}^{-1}$  (50 Å, Figura 3.7D) de acordo com o sugerido pela literatura para complexos formados entre lipossomas catiônicos e DNA (KOLTOVER et al., 1998; MARTIN-HERRANZ et al., 2004). Como estes picos não foram observados nos complexos NE/pIDUA<sub>E</sub> e NEP/pIDUA<sub>E</sub>, pode-se sugerir uma estrutura ainda mais desordenada nestas formulações, com o DNA envolvido pelo núcleo oleoso das nanoemulsões.

As formulações peguiladas foram administradas por via intravenosa em camundongos nocaute MPS I. Os resultados demonstraram o efeito do método de incorporação do pIDUA nas nanoemulsões sobre a atividade e a expressão de *IDUA*. Um aumento da atividade enzimática foi detectado especialmente nos pulmões quando o pIDUA foi adsorvido enquanto que este aumento ocorreu no fígado para a formulação obtida por encapsulamento. Os pulmões e o fígado são frequentemente descritos como os órgãos nos quais se observa a maior eficiência de transfecção, especialmente quando os sistemas de liberação carregados positivamente são

administrados sistemicamente (KANG et al., 2009; KIM et al., 2005; YOO et al., 2004).

Um aumento da expressão de *IDUA* foi observado nos pulmões, fígado e rins dos animais MPS I tratados. Sendo que a maior expressão gênica foi observada nos pulmões dos animais que receberam a formulação obtida pela adsorção do pIDUA, corroborando os achados de atividade enzimática. Fato que pode estar relacionado com o conteúdo em excesso de lipídeo catiônico, o que poderia ocasionar a embolização da formulação nos pulmões (BIVAS-BENITA et al., 2004; LI et al., 1999). É importante mencionar que o modo de associação do ácido nucléico pode estar relacionado com a distribuição preferencial do complexo formado para um ou outro órgão.

Em uma última etapa, investigou-se o efeito da dose e do tempo de sacrifício dos animais sobre a eficiência de transfecção (Capítulo IV). Observou-se uma manutenção da atividade quando uma maior dose de pIDUA foi administrada e os animais sacrificados em um tempo mais longo após injeção. Entretanto, notou-se um incremento na expressão de *IDUA* em órgãos como pulmão e fígado. Nossos resultados demonstram que existe efeito da dose e do tempo sobre a eficiência de transfecção, o que também foi relatado por Kim et al. (2005) e Yoo et al. (2006) em outros modelos experimentais. Além disso, mesmo com a maior dose administrada não foram detectados sinais de toxicidade, como inflamação ou necrose em órgãos como pulmão, baço, fígado e rim dos animais MPS I tratados. Este nosso achado difere do encontrado na literatura, no qual Kwon et al. (2008) observaram, para uma formulação similar contendo DOTAP na relação de cargas +4/- e com a mesma dose que utilizamos, uma toxicidade difundida e danos na arquitetura dos órgãos. Esta diferença poderia ser atribuída à presença de DSPE-PEG em nossa formulação.

Assim, estudos com protocolos de injeções repetidas (semanal ou quinzenal) e avaliação da eficiência de transfecção em tempos mais longos (um a dois meses), que permitam a avaliação de outros parâmetros indicativos de eficiência de transfecção, como a dosagem de glicosaminoglicanos (GAGs) nos tecidos e na urina, representam perspectivas interessantes para os estudos subsequentes a esta tese. Além da avaliação,

em paralelo, da possível toxicidade destes complexos em diferentes órgãos, através de painéis de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

## REFERÊNCIAS

- BARUT, K. D., COSKUN, A. F., ÖNER, F. Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system. **Turkish J Chem**, v.29, p.27-40.2005.
- BIVAS-BENITA, M., OUDSHOORN, M., ROMEIJN, S., VAN MEIJGAARDEN, K., KOERTEN, H., VAN DER MEULEN, H., LAMBERT, G., OTTENHOFF, T., BENITA, S., JUNGINGER, H. and BORCHARD, G. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **J Control Release**, v.100, n.1, p.145-155. 2004.
- BONDÌ, M. L., CRAPARO, E. F. Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n.1, p.7-18. 2010.
- BONFIM, C., KOLISKI, A., BITENCOURT, M., SETUBAL, D., FUNKE, V., RUIZ, J., COUTINHO, E., OLIVEIRA, M., MEDEIROS, L., ZANIS-NETO, J., MEDEIROS, C. R., CAT, I., PASQUINI, R. Stem cell Transplantation for inborn errors of metabolism: a single center experience in 20 patients. **Acta Bioquím Clin Latinoam**, v.1, p.52. 2007.
- BRUXEL, F., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S., MALACHIAS, A., PEREZ, C.A., PANIAGO, R.M., OLIVEIRA, M.C., TEIXEIRA, H.F. Investigation of the structural organization of cationic NE/antisense oligonucleotide complexes. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.1, n.112, p. 530-536, 2013.
- CHESNOY, S., DURAND, D., DOUCET, J., STOLZ, D. B., HUANG, L. Improved DNA/emulsion complex stabilized by poly(ethylene glycol) conjugated phospholipid. **Pharm Res**, v.18, n.10, p.1480-4. 2001.
- CHOI, B. Y., CHUNG, J. W., PARK, J. H., KIM, K. H., KIM, Y. I., KOH, Y. H., KWON, J. W., LEE, K. H., CHOI, H. J., KIM, T. W., KIM, Y. J., CHUNG, H., KWON, I. C. and JEONG, S. Y. Gene delivery to the rat liver using cationic lipid emulsion/DNA complex: comparison between intra-arterial, intraportal and intravenous administration. **Korean J Radiol**, v.3, n.3, p.194-198. 2002.
- CHUNG, S., MA, X., LIU, Y., LEE, D., TITTIGER, M., PONDER, K. P. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alpha-L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. **Mol Genet Metab**, v.90, n.2, p.181-192. 2007.
- COTRIM, A. P., BAUM, B. J. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. **Toxicol Pathol**, v.36, n.1, p.97-103. 2008.

DEISHMANN, A., HACEIN-BEY-ABINA, S., SCHMIDT, M., GARRIGUE, A., BRUGMAN, M. H., HU, J., GLIMM, H., GYAPAY, G., PRUM, B., FRASER, C.C., FISCHER, N., SCHWARZWAELDER, K., SIEGLER, M. L., DE RIDDER, D., PIKE-OVERZET, K., HOWE, S. J., THRASHER, A. J., WAGEMAKER, G., ABEL, U., STAAL, F. J., DELABESSE, E., VILLEVAL, J. L., ARONOW, B., HUE, C., PRINZ, C., WISSLER, M., KLANKE, C., WEISSENBACH, J., ALEXANDER, I., FISCHER, A., VON KALLE, C., CAVAZZANA-CALVO, M. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. **J Clin Invest**, v.117, n.8, p.2225-2232. 2007.

FRAGA, M., LAUX, M., SANTOS, G. R., ZANDONA, B., GIUBERTI, C. S., OLIVEIRA, M., C., MATTE, U. and TEIXEIRA, H. F. Optimization of stearylamine-based NE obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. **J Drug Del Sci Tech**, v.18, n.6, p.398-403. 2008.

FRAGA, M., BRUXEL, F., LAGRANHA, V. L., TEIXEIRA, H. F. and MATTE, U. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. **Int J Nanomedicine**, v.6, p.2213-2220. 2011.

FRAGA, M., BRUXEL, F., DIEL, D., CARVALHO, T. G., PEREZ, C. A., MAGALHÃES-PANIAGO, R., MALACHIAS, A., OLIVEIRA, M. C., MATTE, U., TEIXEIRA, H. F. PEGylated cationic NE can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. submitted. 2014.

HAGIGIT, T., NASSAR, T., BEHAR-COHEN, F., LAMBERT, G. and BENITA, S. The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic NE. **Eur J Pharm Biopharm**, v.70, n.1, p.248-259. 2008.

HARA, T., TAN, Y. and HUANG, L. *In vivo* gene delivery to the liver using reconstituted chylomicron remnants as a novel nonviral vector. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, n.26, p.14547-14552. 1997a.

HARA, T., LIU, F., LIU, D., HUANG, L. Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo. **Adv Drug Del Rev**, v.24, p.265-271. 1997b.

HU, Y., LI, K., WANG, L., YIN, S., ZHANG, Z., ZHANG, Y. Pegylated immunolipopolyplexes: A novel non-viral gene delivery system for liver cancer therapy. **J Control Release**, v.144, p.75-81. 2010.

HUNG, C. F., HWANG, T. L., CHANG, C. C. and FANG, J. Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **Int J Pharm**, v.289, n.1-2, p.197-208. 2005.

KANG, H. S., JIN, S. J., MYUNG, C. S., HWANG, S. J. and PARK, J. S. Delivery of interleukin-18 gene to lung cancer cells using cationic emulsion. **J Drug Target**, v.17, n.1, p.19-28. 2009.

KARMALI, P. P., CHAUDHURI, A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. **Med Res Rev**, v.27, n.5, p.696-722. 2007.

KIM, T. W., CHUNG, H., KWON, I. C., SUNG, H. C. and JEONG, S. Y. *In vivo* gene transfer to the mouse nasal cavity mucosa using a stable cationic lipid emulsion. **Mol Cells**, v.10, n.2, p.142-147. 2000.

KIM, T. W., CHUNG, H., KWON, I. C., SUNG, H. C. and JEONG, S. Y. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as *in vitro* and *in vivo* transfection agents. **Pharm Res**, v.18, n.1, p.54-60. 2001.

KIM, J.K., CHOI, S.H., KIM, C.O., PARK, J.S., AHN, W.S., KIM, C.K. Enhancement of polyethylene glycol (PEG)-modified cationic liposome-mediated gene deliveries: effects on serum stability and transfection efficiency. **J Pharm Pharmacol**, v.55, p.453–460. 2003.

KIM, T. W., CHUNG, H., KWON, I. C., SUNG, H. C., SHIN, B. C. and JEONG, S. Y. Airway gene transfer using cationic emulsion as a mucosal gene carrier. **J Gene Med**, v.7, n.6, p.749-758. 2005.

KOLTOVER, T., RADLER, S. J. O., SAFINYA, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science**, v.281, p.78-81. 1998.

KWON, S. M., NAM, H. Y., NAM, T., PARK, K., LEE, S., KIM, K., KWON, I. C., KIM, J., KANG, D., PARK, J. H. and JEONG, S. Y. *In vivo* time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. **J Control Release**, v.128, n.1, p.89-97. 2008.

LI, S., WU, S. P., WHITMORE, M., LOEFFERT, E. J., WANG, L., SWATKINS, S. C., PITT, B. R., HUANG, L. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. **Am J Physiol**, v.276, p.796–804. 1999.

LIU, F., YANG, J., HUANG, L., LIU, D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. **Pharm Res**, v.13, n.11, p.1642-6. 1996.

LIU, C. H. and YU, S. Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.79, n.2, p.509-515. 2010.

MARTINS, A. M., DUALIBI, A. P., NORATO, D., TAKATA, E. T., SANTOS, E. S., VALADARES, E. R., PORTA, G., DE LUCA, G., MOREIRA, G., PIMENTEL, H., COELHO, J., BRUM, J. M., SEMIONATO-FILHO, J., KERS TENETZKY, M. S., GUIMARÃES, M. R., ROJAS, M. V., ARANDA, P. C., PIRES, R. F., FARIA, R. G., MOTA, R. M., MATTE, U., GUEDES, Z. C. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. **J Pediatr**, v.155, p.S32–S46. 2009.

MARTIN-HERRANZ, A., AHMAD, A., EVANS, H.M., EWERT, K., SCHULZE, U., SAFINYA, C. R., Surface functionalized cationic lipid-DNA complexes for gene delivery: PEGylated lamellar complexes exhibit distinct DNA-DNA interaction regimes. **Biophys J**, v.86, p.1160-1168. 2004.

MOORE, D., CONNOCK, M. J., WRAITH, E., LAVERY, C. The prevalence of and survival in mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie, and Scheie syndromes in the UK. **Orphanet J Rare Dis**, v.3, n.24, p.1-7. 2008.

- NAM, H. Y., PARK, J. H., KIM, K., KWON, I. C., JEONG, S. Y. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. **Arch Pharm Res**, v.3, n.5, p.639-646. 2009.
- NARDI, N. B., TEIXEIRA, L. A. K., SILVA, E. F. A. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.1, p.109-116. 2002.
- PASTORES, G. M., ARN, P., BECK, M., CLARKE, J. T., GUFFON, N., KAPLAN, P., MUENZER, J., NORATO, D. Y., SHAPIRO, E., THOMAS, J., VISKOCHIL, D., WRAITH, J. E. The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with mucopolysaccharidosis Type I. **Mol Genet Metab**, v.91, n.1, p.37-47. 2007.
- TEIXEIRA, H., DUBERNET, C., ROSILIO, V., LAIGLE, A., DEVERRE, J. R., SCHERMAN, D., BENITA, S. and COUVREUR, P. Factors influencing the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. **J Control Release**, v.70, n.1-2, p.243-255. 2001a.
- TEIXEIRA, H., ROSILIO, V., LAIGLE, A., LEPAULT, J., ERK, I., SCHERMAN, D., BENITA, S., COUVREUR, P. and DUBERNET, C. Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. **Biophys Chem**, v.92, n.3, p.169-181. 2001b.
- TRAAS, A. M., WANG, P., MA, X., TITTIGER, M., SCHALLER, L., O'DONNELL, P., SLEEPER, M. M., VITE, C., HERATI, R., AGUIRRE, G. D., HASKINS, M., PONDER, K. P. Correction of clinical manifestations of canine mucopolysaccharidosis I with neonatal retroviral vector gene therapy. **Mol Ther**, v.15, n.8, p.1423-1431. 2007.
- TRIMAILLE, T., CHAIX, C., PICHOT, C. and DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **J Colloid Interface Sci**, v.258, n.1, p.135-145. 2003.
- VARGA, Z., WACHA, A., VAINIO, U., GUMMEL, J., BÓTA, A. Characterization of the PEG layer of sterically stabilized liposomes: a SAXS study. **Chem Phys Lipids**, v.165, p.387-392. 2012.
- YOO, H. S., KWON, S. M., KIM, Y. J., CHUNG, H., KWON, I. C., KIM, J. and JEONG, S. Y. Cationic lipid emulsions containing heavy oils for the transfection of adherent cells. **J Control Release**, v.98, n.1, p.179-188. 2004.
- YOO, H. S., MAZDA, O., LEE, H. Y., KIM, J. C., KWON, S. M., LEE, J. E., KWON, I. C., JEONG, H., JEONG, Y. S. and JEONG, S. Y. *In vivo* gene therapy of type I diabetic mellitus using a cationic emulsion containing an Epstein Barr Virus (EBV) based plasmid vector. **J Control Release**, v.112, n.1, p.139-144. 2006.



**CONCLUSÕES**

---



- Foram obtidas nanoemulsões catiônicas peguiladas monodispersas com diâmetro de gotícula próximo a 200 nm e potencial- $\zeta$  positivo através do procedimento de homogeneização à alta pressão.
- O plasmídeo pIDUA foi associado às nanoemulsões catiônicas peguiladas por adsorção ou encapsulamento de complexos pré-formados entre o pIDUA e o lipídeo catiônico na fase interna das nanoemulsões.
- A organização estrutural das nanoemulsões catiônicas peguiladas parece envolver arranjos em fase lamelar, estrutura não observada para os complexos formados com pIDUA.
- O fosfolípido DSPE-PEG desempenhou um papel importante na manutenção da estabilidade dos complexos tanto na presença de proteínas do soro quanto em função do tempo.
- O modo de incorporação do pIDUA teve efeito na sua descomplexação, sendo observada uma rápida descomplexação a partir dos complexos obtidos por adsorção, enquanto o complexo obtido por encapsulamento persiste em tempos longos em meio contendo proteínas do soro.
- O modo de associação do pIDUA teve efeito sobre o local de maior transfecção, sendo nos pulmões para os complexos nos quais o pIDUA foi adsorvido e no fígado para os complexos nos quais o pIDUA foi encapsulado a partir do complexo pré-formado com o lipídeo catiônico DOTAP.
- A dose e o tempo são fatores que influenciam na eficiência de transfecção, sendo que a maior dose administrada e um maior tempo de sacrifício após administração conduzem à manutenção da atividade enzimática e ao aumento da expressão do gene *IDUA* nos pulmões, fígado e rins dos animais MPS I.
- Os complexos administrados na maior dose não apresentaram nenhum sinal de toxicidade a partir de achados histológicos em diferentes órgãos.
- O conjunto de resultados demonstra a potencialidade das nanoemulsões catiônicas peguiladas como um sistema eficiente de transferência de genes para o modelo murino de MPS I.