

INTRODUÇÃO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença causada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), a qual é responsável pela degradação de glicosaminoglicanos nos lisossomos. O acúmulo destes ocasiona diversas manifestações clínicas. Atualmente uma das abordagens terapêuticas proposta para o tratamento da MPS I é a utilização de sistemas lipídicos como vetores gênicos, e dentre eles destacam-se as nanoemulsões catiônicas.

OBJETIVO

O presente trabalho visou avaliar a aplicação de nanoemulsões catiônicas contendo o plasmídeo pIDUA, o qual contém o gene que codifica para enzima IDUA, como um sistema de transferência gênica para o modelo murino de MPS I.

METODOLOGIA

Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões catiônicas constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média, estabilizadas por uma mistura do lipídeo catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano, fosfolipídeos dioleilfosfatidiletanolamina (NE) e diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DPSPE-PEG) (NEP) foram obtidas pelo procedimento de homogeneização à alta pressão.

Caracterização físico-química

O diâmetro médio das nanoemulsões foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (PCS). O potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer.

Complexação e estabilidade

A complexação do pIDUA com a NE e a NEP foi analisada por meio do ensaio de retenção em gel de agarose 1%. A verificação da estabilidade foi realizada através da incubação dos complexos com a enzima DNase I.

Ensaio de descomplexação

A descomplexação do pIDUA dos complexos foi avaliada após incubação em meio de cultura na presença e na ausência de soro fetal bovino (SFB) em diferentes tempos.

Ensaio *in vivo*

Os complexos foram administrados intravenosamente em camundongos nocaute MPS I e a eficiência de transfecção foi avaliada através da dosagem da atividade enzimática por ensaio fluorimétrico e da quantificação da expressão gênica de IDUA através da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Como controle, foram utilizados camundongos MPS I não tratados.

RESULTADOS

A complexação do pIDUA tende a aumentar o diâmetro e diminuir o potencial zeta das formulações. Os complexos apresentaram um diâmetro médio de 262 nm e um potencial zeta de +3,3 e -6,1 mV para NE e NEP respectivamente. A complexação total do pIDUA com as nanoemulsões foi observado a partir da relação de cargas +2/-. Nesta mesma condição foi possível verificar a proteção do pIDUA da digestão pela enzima DNase I. As propriedades físico-químicas e a estabilidade dos complexos na presença de proteínas do soro foram influenciadas principalmente pela presença de DSPE-PEG (Figura 1).

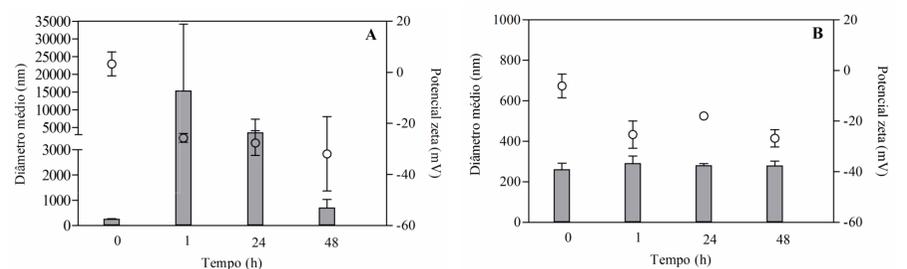


Figura 1. Propriedades físico-químicas das formulações NE (A) e NEP (B) na relação de carga +4/-, após incubação com meio de cultura na presença de SFB 10%. As barras representam o diâmetro médio e os círculos o potencial zeta. Teste t de Student ($p < 0,05$)

Após o tratamento com NEP/pIDUA na relação de cargas +4/- intravenosamente injetado nos camundongos nocautes MPS I, observou-se que houve um aumento significativo na atividade (Figura 2) e na expressão de IDUA (Figura 3) em diferentes órgãos, especialmente nos pulmões.

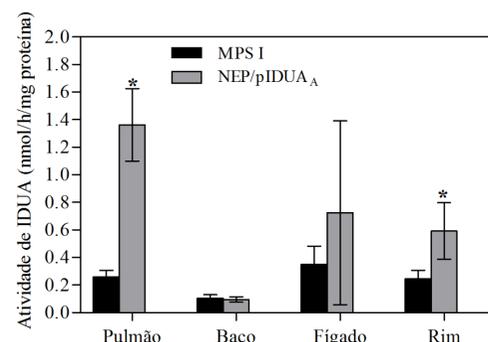


Figura 2. Atividade de IDUA em diferentes órgãos de camundongos MPS I tratados com NEP/pIDUA na relação de cargas +4/-, administrada pela via intravenosa. * $p < 0,05$, comparado aos animais não tratados MPS I (controle negativo) (ANOVA seguida de post hoc de Tukey).

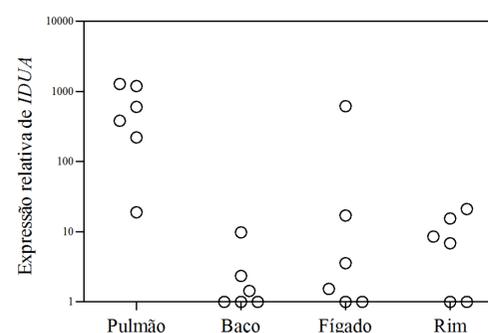


Figura 3. Expressão relativa de IDUA por PCR em tempo real em diferentes órgãos de camundongos MPS I tratados com NEP/pIDUA na relação de cargas +4/-, administrada pela via intravenosa.

CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que nanoemulsões catiônicas peguiladas representam um potencial sistema terapêutico para o tratamento da MPS I.