

Introdução

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença genética associada à deficiência de produção da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), o que acarreta acúmulo lisossômico de glicosaminoglicanos resultando em complicações neurológicas e de mobilidade ao paciente. Tal condição não tem cura e os tratamentos disponíveis possuem diversas restrições. Como alternativa, a terapia gênica não-viral para a MPS I tem sido proposta.

Recentemente, nosso grupo descreveu resultados promissores utilizando nanoemulsões catiônicas peguilladas como carreadores não virais para o plasmídeo pIDUA que expressa IDUA. Os complexos pIDUA/nanoemulsões foram preparados por adsorção ou encapsulamento e administrados na dose de 30 µg em modelo murino de MPS I. Após 48 horas, obteve-se aumento significativo da expressão e da atividade da enzima IDUA em diferentes órgãos, especialmente nos pulmões e fígado.

Objetivo

Avaliar o efeito da dose (30 µg ou 60 µg) e do tempo (48 h - 2 dias ou 168 h - 7 dias) na eficiência de transfecção do pIDUA, complexado com nanoemulsões catiônicas peguilladas.

Metodologia

As nanoemulsões catiônicas foram compostas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média, estabilizado por uma mistura do lipídeo catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP), fosfolípidos dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DPSPE-PEG), sendo obtidas pelo procedimento de homogeneização à alta pressão. As formulações contendo pIDUA foram obtidas por adsorção (NEP/pIDUA_A) ou por encapsulamento (NEP/pIDUA_E) do plasmídeo, na razão de cargas +4/- (Fig.1). Os complexos foram caracterizados em termos de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (i.p.) e potencial zeta determinados por espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética.

No ensaio *in vivo*, os complexos foram administrados pela veia caudal de camundongos nocaute MPS I nas doses de 30 µg ou 60 µg de pIDUA. O sacrifício se deu após 48 h (2 dias) ou 168 h (7 dias), e os órgãos fígado, rins, baço e pulmões foram removidos para avaliação da expressão gênica, pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, e da dosagem enzimática, através de ensaio fluorométrico.

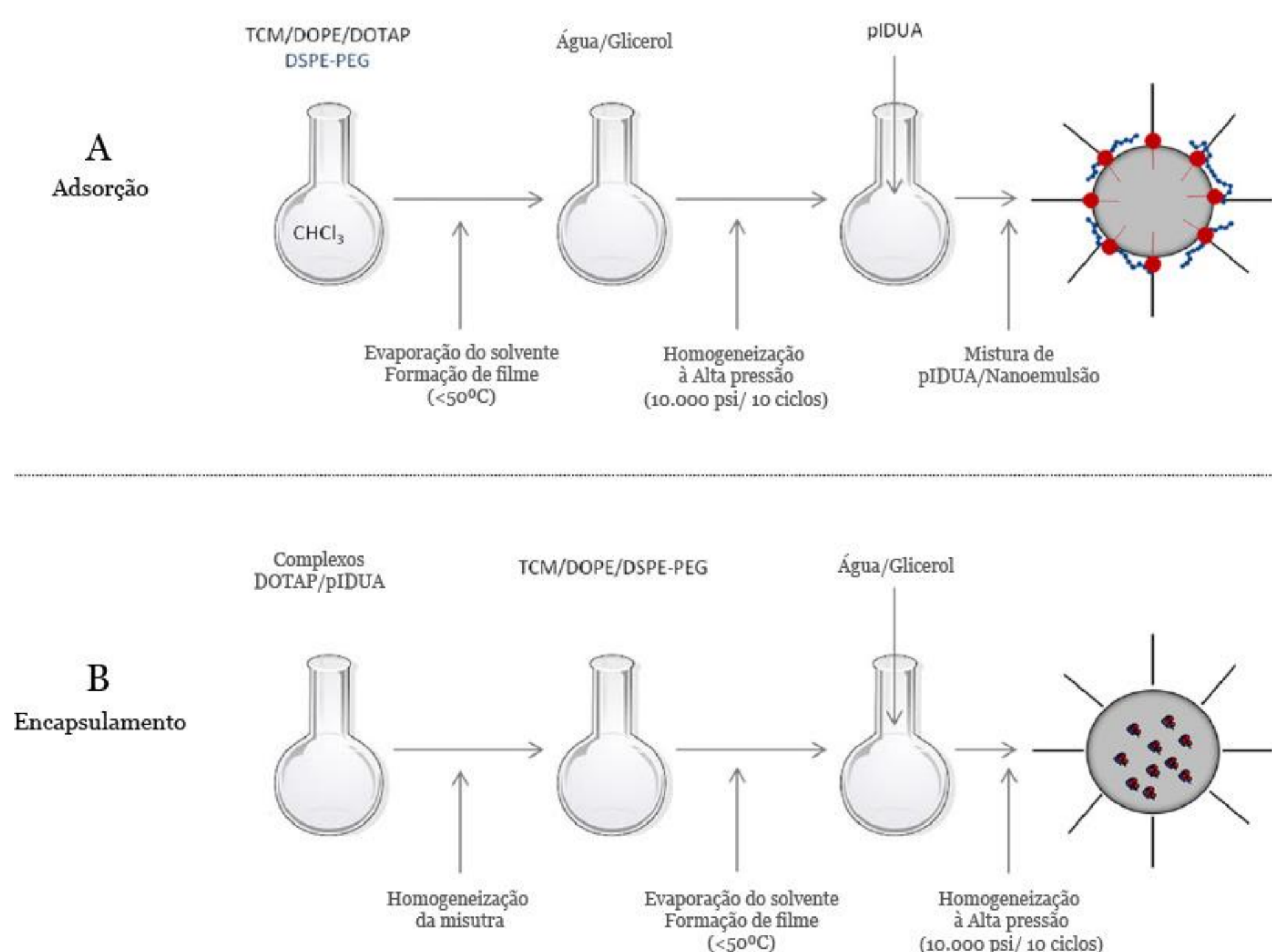


Figura 1. Representação das preparações dos complexos de nanoemulsão/pIDUA por adsorção ou encapsulamento.

Resultados

A tabela 1 apresenta os resultados relativos as propriedades físico-químicas dos complexos. Como pode ser observado, as formulações apresentaram-se monodispersas (ip<0,21) e diâmetro próximo a 250nm. A complexação do pIDUA inverte o potencial-ζ de cerca de +14mV para -9mV.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de nanoemulsões brancas e complexos pIDUA.

Amostra	Tamanho de gotícula (nm)	I.P.	Potencial ζ (mV)
NEP	225.8±1.5	0.10±0.06	+14.1±1.4
NEP/pIDUA _A	263.9±20.2	0.05±0.03	-9.8±6.7
NEP/pIDUA _E	242.5±2.1	0.12±0.04	-8.4±1.1

IDUA foi expressa em todos os órgãos avaliados (Fig. 2). Pode ser observado um aumento significativo da expressão relativa com a dose de 60 µg e após 7 dias de injeção, especialmente em rins e fígado, utilizando os dois tipos de formulações. A expressão foi maior nos pulmões quando a dose de 60 µg foi administrada usando complexo obtido por adsorção (NEP/pIDUA_A).

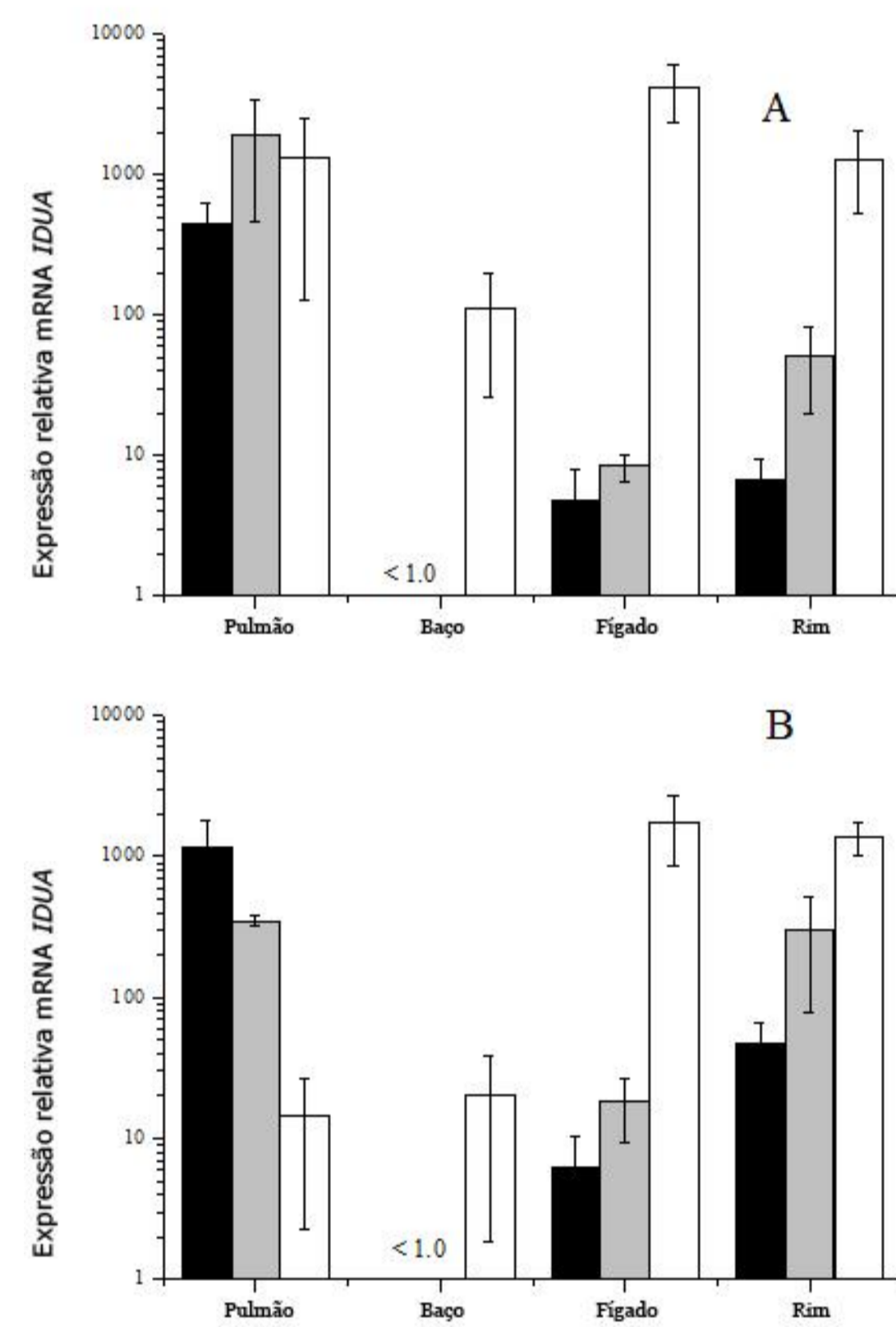


Figura 2. Expressão relativa de IDUA por RT-qPCR em diferentes órgãos de camundongos MPS I tratados com NEP/pIDUA_A (A) ou NEP/pIDUA_E (B). Camundongos foram tratados com 30 µg de IDUA (barras pretas) ou 60 µg de IDUA (barras cinzas) e sacrificados depois de 2 dias, ou tratados com 60 µg de IDUA e sacrificados após 7 dias (barras brancas) da injeção intravenosa.

A atividade IDUA demonstrou ser significativamente superior, em fígado e pulmões, com administração de maior dose e com um maior tempo de transfecção, independente da formulação utilizada (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade IDUA em diferentes órgãos de camundongos MPS I tratados com NEP/pIDUA_A ou NEP/pIDUA_E.

		Atividade IDUA (nmol/h/mg de proteína)			
		Pulmão	Baço	Fígado	Rim
30µg/2-dias [#]	NEP/pIDUA _A	1.36±0.13*	0.10±0.01	0.73±0.03*	0.59±0.10*
	NEP/pIDUA _E	0.39±0.07	0.17±0.02*	1.10±0.03	0.59±0.02*
60µg/2-dias	NEP/pIDUA _A	0.28±0.03	0.14±0.01	0.48±0.06	0.24±0.03
	NEP/pIDUA _E	0.27±0.05	0.18±0.05	0.61±0.03*	0.28±0.03
60µg/7-dias	NEP/pIDUA _A	0.41±0.04*	0.12±0.05	0.55±0.05*	0.29±0.10
	NEP/pIDUA _E	0.42±0.06*	0.03±0.008	0.54±0.04*	0.23±0.03
MPS I	-	0.26±0.02	0.10±0.01	0.35±0.06	0.25±0.03

Atividade IDUA mostrada em nmol/h/mg de proteína. Resultados representam a média ± erro padrão da média. *Diferença entre camundongos MPS I tratados e não tratados (Student's T-test, p < 0.05).

Conclusão

Nanoemulsões catiônicas peguilladas são promissoras vetores para pIDUA na terapia gênica da MPS I e os fatores dose de IDUA e tempo são importantes parâmetros na eficiência de transfecção.