

Camila Vieira Pinheiro¹; Helder Ferreira Teixeira²

¹ Centro de Terapia Gênica. Centro de Pesquisa Experimental. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
² Faculdade de farmácia. Laboratório de Desenvolvimento Galênico. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

INTRODUÇÃO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de depósito lisossômico causada por mutações no gene da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), o que impossibilita a degradação dos glicosaminoglicanos heparan e dermatan sulfato em diversos tecidos, levando a sintomas multissistêmicos. Como os tratamentos disponíveis apresentam restrições, dentre as abordagens terapêuticas encontra-se a edição gênica, que consiste na correção do defeito genético causador da doença. Desta forma, este projeto visa ao desenvolvimento de lipossomas como vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 para fins de edição gênica de fibroblastos, através da correção do gene *IDUA*.

OBJETIVO

Desenvolver os vetores lipossomais e avaliar sua eficiência de transfecção *in vitro* em fibroblastos de pacientes MPS I.

METODOLOGIA

lipossomas contendo DOPE, DOTAP e DSPE-PEG foram obtidos por homogeneização à alta pressão



A obtenção de **complexos dos lipossomas** com o DNA foi realizada por adsorção extemporânea na razão de cargas +4/-1.

As **formulações e complexos** foram caracterizados em termos de **diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.**



A **complexação** entre o DNA e os lipossomas foi avaliada através do ensaio de **retenção em gel de agarose.**

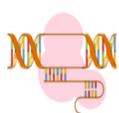
Lipossomas + DNA

Transfecção

Fibroblastos de pacientes MPSI

MTT

Atividade enzimática de IDUA



RESULTADOS

❖ PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de L, LA, LP e LPA.

Formulação	Tamanho da gotícula (nm)	P.I.	Potencial ζ (mV)
L	181.5 ± 3.0	0.57 ± 0.12	+ 46.5 ± 5.9
LA +4/-1	207.9 ± 2.2 ^a	0.60 ± 0.12	+ 38.3 ± 2.7 ^b
LP	98.5 ± 1.0	0.32 ± 0.11	+ 38.3 ± 2.9
LPA +4/-1	134.9 ± 2.3 ^a	0.18 ± 0.09	+ 32.3 ± 3.2 ^b

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos; diferença antes e depois da complexação. Teste T de Student, $p < 0.05$. ^a Diâmetro médio. ^b Potencial zeta.

❖ RETENÇÃO EM GEL DE AGAROSE

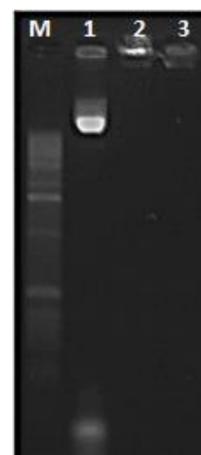


Figura 1. Gel de eletroforese com CRISPR/Oligo nus livres e dos complexos formados com lipossomas catiônicos e CRISPR/Oligo. M= Marcador de peso molecular; 1= CRISPR/Oligo nus; 2= LA CRISPR/Oligo; 3= LPA CRISPR/Oligo.

❖ VIABILIDADE CELULAR

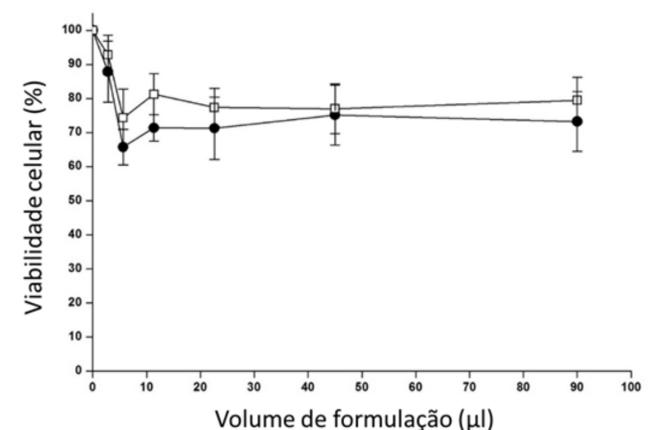


Figura 2. Viabilidade celular de fibroblastos de pacientes MPS I frente à incubação com quantidades crescentes de lipossoma branco (L) (●) e dos complexos LPA (□). Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

❖ ATIVIDADE ENZIMÁTICA

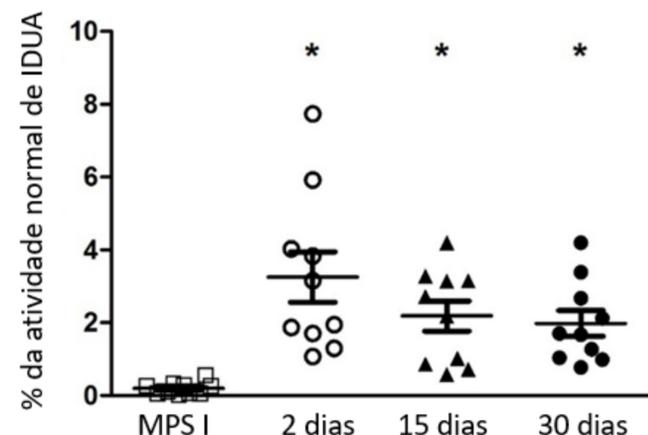


Figura 3. Eficiência de transfecção: porcentagem da atividade de IDUA em células normais após incubação com os complexos LPA. Fibroblastos MPS I não tratados e fibroblastos MPS I tratados com LPA após 2, 15 e 30 dias de cultura. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos, * $p < 0.05$ comparado a fibroblastos MPS I não tratados.

CONCLUSÃO

A partir do conjunto de resultados, conclui-se que os lipossomas são eficientes vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 juntamente com o oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene *IDUA*, e os complexos demonstraram eficiência de transfecção, pois promoveram um aumento significativo da atividade de IDUA em fibroblastos de pacientes MPS I.