

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Avaliação da segurança e eficácia da administração de vetores do sistema
CRISPR/Cas9 para tratamento dos sintomas articulares da mucopolissacaridose
tipo I**

Letícia Jesus Hipólito de Souza

**Orientadora: Prof^a. Dra. Ursula Matte
Coorientadora: Prof^a. Dra. Roselena Silvestri Schuh**

Porto Alegre

Abril de 2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Avaliação da segurança e eficácia da administração de vetores do sistema
CRISPR/Cas9 para tratamento dos sintomas articulares da mucopolissacaridose
tipo I**

Letícia Jesus Hipólito de Souza

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**

**Orientadora: Prof^ª. Dra. Ursula Matte
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Roselena Silvestri Schuh**

Porto Alegre

Abril de 2024

INSTITUIÇÕES E AGENTES FINANCIADORES

Este trabalho foi desenvolvido em (i) Laboratório de Células, Tecidos e Genes (CTG) do Centro de pesquisa experimental (CPE) e na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sob aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), projeto de número 20220071 e (ii) Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) do Departamento de Produção de Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Susilaine e Marcos, à minha irmã, Larissa, à minha tia, Edilaine, e à minha avó, Maria de Fátima, por todo suporte, carinho e acolhimento.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ursula Matte, que me aconselhou em diversos momentos e com quem aprendi muito sobre metodologia científica, sempre me estimulando a fazer as indagações corretas.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Roselena Schuh, por todo conhecimento que me transmitiu e por ter doado tanto do seu tempo para que tirasse minhas dúvidas.

Ao Programa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todas excelentes linhas de pesquisa que pude conhecer através dos seminários, pelas disciplinas que pude cursar, oferecidas por um excelente corpo docente, e ao secretário, Elmo, por sempre esclarecer minhas dúvidas em relação ao programa.

À Profa. Dra. Flávia Fachel, que me ensinou muito sobre cultura celular e com quem tive liberdade de tirar inúmeras dúvidas farmacêuticas.

À Dra. Patrícia Grudzinski, que esteve diversas vezes ao meu lado na bancada e com quem pude aprender muito sobre organização em rotina de laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Células, Tecidos e Genes (CTG), por toda ajuda, pela troca de conhecimento, e por me animarem mesmo nos dias mais cansativos.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pelo preparo da nanoformulação utilizada neste estudo.

Aos funcionários da UPL (HCPA), pela ótima organização e manutenção da sala de cultura celular. Às funcionárias da UEA (HCPA), Marta Cioatto, Daniela Campagn e Tuane Garcez, por prestarem auxílio durante os procedimentos em camundongos.

Às minhas colegas do grupo de pesquisa, Marina e Lariane, que me aconselharam e tranquilizaram durante este período.

Ao meu amigo, Pedro, e às minhas amigas, Daiana, Camila, Helouise e Luana por terem comemorado comigo os melhores momentos e zelado por mim nos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Mucopolissacaridose tipo I.....	11
1.2 Patofisiologia.....	12
1.2.1. Disfunção articular.....	13
1.4 Tratamentos.....	16
1.5 Edição gênica.....	18
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. RESULTADOS.....	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Cas9	do inglês, CRISPR associated protein 9
cDNA	do inglês, complementary DNA
CRISPR	do inglês, clustered regularly interspaced palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA guide
DNA	do inglês, deoxyribonucleic acid
DPD	Deoxipiridinolina
DS	Dermatan sulfato
EF1α	do inglês, Elongation Factor 1-alpha
FLS	do inglês, fibroblast-like synoviocytes
GAGs	Glicosaminoglicanos
gRNA/sgRNA	do inglês, guide RNA/single guide RNA
HDR	do inglês, homology directed repair
HS	Heparan sulfato
IDUA	Alfa-L-iduronidase
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
M6F	Manose-6-fosfato
MPS I -S	Síndrome de Scheie
MPS I - H	Síndrome de Hurler
MPS I - H / S	Síndrome de Hurler-Scheie
MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
MPS II	Mucopolissacaridose tipo II

MPS III	Mucopolissacaridose tipo III
MPS IV	Mucopolissacaridose tipo IV
MPS VI	Mucopolissacaridose tipo VI
MPS VII	Mucopolissacaridose tipo VII
mRNA	RNA mensageiro
NLRP3	do inglês, NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NLS	do inglês, nuclear localization signal
PAM	do inglês, protospacer adjacent motif
PCR	do inglês, polymerase chain reaction
PYD	do inglês, pyridinoline
RNA	do inglês, ribonucleic acid
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
TCU	Transplante de cordão umbilical
TGF-β	do inglês, transforming growth factor-beta
TLR-4	do inglês, toll-like receptor 4
TNF-α	do inglês, tumor necrosis factor-alpha
tracrRNA	do inglês, trans-activating CRISPR RNA
TRE	Terapia de reposição enzimática
WPRE	do inglês, Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossomal causada por mutações no gene *IDUA* que codifica a proteína alfa-L-iduronidase (IDUA), responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de dermatano e sulfato de heparano no interior dos lisossomos. A MPS I impacta no funcionamento dos sistemas respiratório, cardíaco, neurológico e em componentes do sistema sensorial como audição e visão. As disfunções articulares surgem na grande maioria dos acometidos com MPS I e geralmente precedem o diagnóstico. O acúmulo de GAGs estimula o recrutamento de células inflamatórias para o interior do ambiente articular, as quais secretam citocinas inflamatórias e contribuem para o enrijecimento e dor. A matriz cartilaginosa densa e avascular da articulação dificulta a penetração de fármacos em seu interior, o que é um desafio para a terapia de reposição enzimática, tratamento convencional atualmente utilizado em pacientes com MPS I. Levando em consideração esse obstáculo, o presente estudo se propôs a desenvolver e avaliar a segurança e eficácia da administração intra-articular de dois plasmídeos - um doador do gene *Idua* e um plasmídeo codificante da proteína Cas9 - adsorvidos a uma nanoemulsão catiônica carreadora de um anti-inflamatório esteroide em camundongos modelo de MPS I. Inicialmente, testamos o efeito do tratamento na viabilidade mitocondrial de fibroblastos semelhantes a sinoviócitos extraídos de joelho de camundongos MPS I. O potencial irritante dos complexos nanoemulsionados também foi avaliado em membrana cório-alantoide de ovo de galinha no teste HET-CAM. A formulação não se mostrou citotóxica ou irritante nos testes *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, a administração dos complexos pela via intra-articular em camundongos MPS I revelou que animais que receberam o tratamento demonstraram menores níveis de citocinas inflamatórias (IL-6) e tiveram aumento significativo da atividade de IDUA em líquido sinovial. Em suma, o tratamento desenvolvido se mostrou seguro, não gerou inflamação local e apresentou alta retenção no interior da cápsula articular, além de ser eficaz no aumento da atividade da enzima IDUA na cavidade articular de camundongos MPS I após edição gênica *in situ*. Como perspectivas faz-se necessário avaliar o efeito do tratamento em um maior período pós-administração, além de observar se, de fato, há diminuição do acúmulo de GAGs e melhora nos sintomas

ostearticulares. Ainda assim, o produto desenvolvido possui potencial no tratamento *in situ* dos sintomas articulares da MPS I.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal disease caused by mutations in the *IDUA* gene that encodes the protein alpha-L-iduronidase (IDUA), responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs) dermatan sulfate and heparan sulfate within lysosomes. MPS I impacts the functioning of the respiratory, cardiac, neurological systems and components of the sensory system such as hearing and vision. Joint dysfunctions appear in the vast majority of those affected with MPS I and generally precede the diagnosis. The accumulation of GAGs stimulates the recruitment of inflammatory cells into the joint environment, which secrete inflammatory cytokines and contribute to stiffness and pain. The dense and avascular cartilaginous matrix of the joint makes it difficult for drugs to penetrate its interior, which is a challenge for enzyme replacement therapy, a conventional treatment currently used in patients with MPS I. Taking this obstacle into account, the present study proposed to develop and evaluate the safety and efficacy of intra-articular administration of two plasmids - a donor of the *Idua* gene and a plasmid encoding the Cas9 protein - adsorbed to a cationic nanoemulsion carrying a steroidal anti-inflammatory drug in MPS I model mice. Initially, we tested the effect of treatment on the mitochondrial viability of synoviocyte-like fibroblasts extracted from the knees of MPS I mice. The irritating potential of nanoemulsified complexes was also evaluated in chicken egg chorio-allantoic membrane in the HET-CAM test. The formulation did not prove to be cytotoxic or irritating in in vitro tests. In in vivo tests, administration of the complexes intra-articularly in MPS I mice revealed that animals that received the treatment demonstrated lower levels of inflammatory cytokines (IL-6) and had a significant increase in IDUA activity in synovial fluid. In short, the developed treatment proved to be safe, did not generate local inflammation and showed high retention within the joint capsule, in addition to being effective in increasing the activity of the IDUA enzyme in the joint cavity of MPS I mice after in situ gene editing. As perspectives, it is necessary to evaluate the effect of the treatment in a longer post-administration period, in addition to observing whether, in fact, there is a reduction in the accumulation of GAGs and an improvement in osteoarticular symptoms. Even so, the developed product has potential in the in situ treatment of MPS I joint symptoms.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mucopolissacaridose tipo I

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de onze doenças raras e hereditárias causadas por deficiências em enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs são carboidratos complexos, componentes da matriz extracelular. A degradação deficiente dessas moléculas provoca o acúmulo nas células, afetando sua homeostase, pois compromete alguns processos celulares, entre eles, endocitose, autofagia e absorção de nutrientes causando danos gerais nos tecidos e órgãos, resultando em disfunção orgânica generalizada podendo levar o paciente à morte nos primeiros anos de vida (Neufeld e Muenzer, 2001).

A prevalência mundial de nascimento com MPS é de 1,57 para cada 100.000, variando de acordo com o país, região ou etnia (Çelik et al., 2021). As MPS I, III, IV, VI e VII são autossômicas recessivas, enquanto que a do tipo II é recessiva ligada ao X. O grau de comprometimento da degradação é variável nos pacientes, levando a uma gama de apresentações clínicas, mesmo quando se trata do mesmo tipo de MPS (Neufeld e Muenzer, 2007). Existe uma diversidade de manifestações clínicas que acometem os portadores dessas doenças, entre elas, características faciais grosseiras, alterações esqueléticas, articulares, dentárias, hepatomegalia, esplenomegalia, doença respiratória e cardíaca, perda de visão e audição, que podem estar associadas a distúrbios comportamentais e neurológicos (Muenzer; Wraith e Clarke, 2009).

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) afeta cerca de 1:100.000 nascidos vivos e é causada por mutações no gene da enzima lisossômica alfa-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76) (Giugliani, 2012), que atua na degradação dos GAGs sulfato de heparano e sulfato de dermatano em múltiplos tecidos. Esta doença apresenta um contínuo de gravidade clínica conhecido como três síndromes. A síndrome de Hurler (MPS I - H) é a mais prevalente, acometendo 57% dos diagnosticados com MPS I e possui a apresentação clínica mais severa marcada por disfunções no desenvolvimento motor e neurológico, hepatoesplenomegalia, valvulopatia, opacificação da córnea e hidrocefalia, com início dos sintomas se iniciando até os dois anos de idade. Sem tratamento, os pacientes com apresentações mais graves possuem uma expectativa de vida que varia de seis a oito anos. A síndrome Hurler-Scheie (MPS I - H / S), a forma intermediária ou moderada, tem

surgimento dos sintomas entre 3 e 8 anos de idade e os pacientes apresentam disfunções osteoarticulares e opacidade de córnea. Acometidos com o fenótipo de Scheie (MPS I - S) têm início dos sintomas entre os 5 a 15 anos de vida e deficiências ortopédicas são a principal manifestação clínica. No entanto, a categorização em síndromes é arbitrária, visto que na prática clínica o que se observa é um contínuo da gravidade dos sintomas que podem atingir diferentes sistemas. Ademais, não há base bioquímica ou molecular para esta delimitação classificatória (Martins et. al, 2009).

A MPS I pode ser causada por diferentes mutações no gene *IDUA* e alguns estudos buscam prever o fenótipo de acordo com a natureza e a posição da mutação. As mutações com frequências mais elevadas na população brasileira demonstram uma associação significativa com o fenótipo grave da MPS I, sendo a p.Trp402Ter a primeira descrita e a mais prevalente. Nesta mutação, há substituição de uma base única que gera inserção de um códon de parada prematuro inviabilizando a produção de IDUA funcional (Poletto et al., 2018). Uma revisão de literatura conduzida por Terlato e Cox (2003) constatou que pacientes que possuem mutação sem sentido em ambos os alelos apresentam o fenótipo grave devido à nulidade de atividade enzimática de IDUA. A grande maioria das mutações em local de *splicing* e de inserção/deleção possuem o mesmo efeito, isto devido à geração de efeitos deletérios como interrupção da tradução ou transcrição e instabilidade do RNA mensageiro (mRNA). As mutações de sentido trocado são as que possuem maiores chances de apresentar atividade enzimática residual, e, mesmo em combinação com um segundo alelo que gera perda de função, a presença de um alelo com mutação de sentido trocado pode ser protetora contra a apresentação de um fenótipo grave. Cerca de 97,5% dos pacientes com fenótipo atenuado possuem pelo menos um alelo com mutação de sentido trocado e mais de 45% desses possuem um segundo alelo que gera perda de função (Kubaski et al., 2020). No entanto, a troca de determinados aminoácidos como p.R489P e p.P496R está associada ao fenótipo grave. Atualmente, é possível prever o fenótipo da maioria dos pacientes obtendo-se o genótipo, no entanto, ainda há variantes que possuem efeito desconhecido na atividade enzimática (Terlato e Cox, 2003; Clarke et. al, 2009).

1.2 Patofisiologia

As moléculas degradadas pela enzima IDUA, sulfato de heparano (HS) e sulfato de dermatano (DS), são encontradas livres na matriz celular. Também compõem a estrutura de

diferentes tipos de proteoglicanos, essenciais para a estrutura dos tecidos e para a comunicação intercelular, além de modular processos bioquímicos como regulação do crescimento, proliferação e serem reservatórios e co-receptores de moléculas sinalizadoras (Hampe et al., 2020; Fecarotta et al., 2020). Na MPS, o aumento de HS e DS é observado na urina e no soro dos pacientes. Esse excesso no ambiente extracelular aumenta a absorção de água pelos tecidos, provocando inchaço e desorganizando fibras de colágeno e elastina (Campos e Monaga, 2012).

Em nível intracelular, a deficiência enzimática e o acúmulo de GAGs gera aumento do volume lisossomal ocupado no ambiente intracelular, causando ruptura de suas membranas e comprometendo o tráfego de vesículas. O microambiente lisossomal é bastante distinto do ambiente citoplasmático - o pH em seu interior é ácido e rico em enzimas hidrolíticas, condições necessárias para a degradação de macromoléculas. O vazamento de seu conteúdo enzimático, de prótons e de Ca^{2+} para o citoplasma desencadeia perturbação da homeostase iônica, aumento de espécies reativas de oxigênio e o início de vias de sinalização que contribuem para o estresse oxidativo, necrose e apoptose (Platt, Boland e van der Spoel, 2012). Perante tais sinais de estresse celular e do vazamento de caspase B dos lisossomos, superexpressa na MPS I (Gonzalez et al., 2018), há ativação do inflamassoma NLRP3 (do inglês *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*), que aumenta a expressão de caspase I e pró-IL-1 β . Além disso, é capaz de provocar piroptose, uma morte celular inflamatória programada (Parker e Bigger, 2019; Swanson, Deng e Ting, 2019; Latz, Xiao e Stutz, 2013). O aumento da resposta inflamatória decorrente do acúmulo de GAGs também ocorre através da ativação de TLR-4 (do inglês *toll-like receptor 4*), que estimula a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Wilkinson et al., 2012; Hampe et al., 2020).

1.2.1. Disfunção articular

A articulação, em sua superfície, é composta por cartilagem hialina, que diminui a transmissão de impactos mecânicos para o osso subcondral. Sua matriz extracelular é composta principalmente por proteoglicanos e colágeno tipo II. A cápsula articular, constituída de tecido conjuntivo fibroso, é preenchida por fluido sinovial, produzido por sinoviócitos tipo B ou FLS (*Fibroblast-like synoviocytes*) na membrana sinovial. O fluido sinovial possui constituição similar ao plasma, porém, menor concentração proteica e

acréscimo de ácido hialurônico e lubrificina, macromoléculas essenciais para viscosidade ideal do líquido e lubrificação articular (Zhao et al., 2023; Huang et al., 2022). A viscosidade pode ser diminuída em quadros inflamatórios quando neutrófilos liberam enzimas lisossomais capazes de desfazer a polimerização, por exemplo, prejudicando sua função lubrificante (Brannan e Jerrard, 2006).

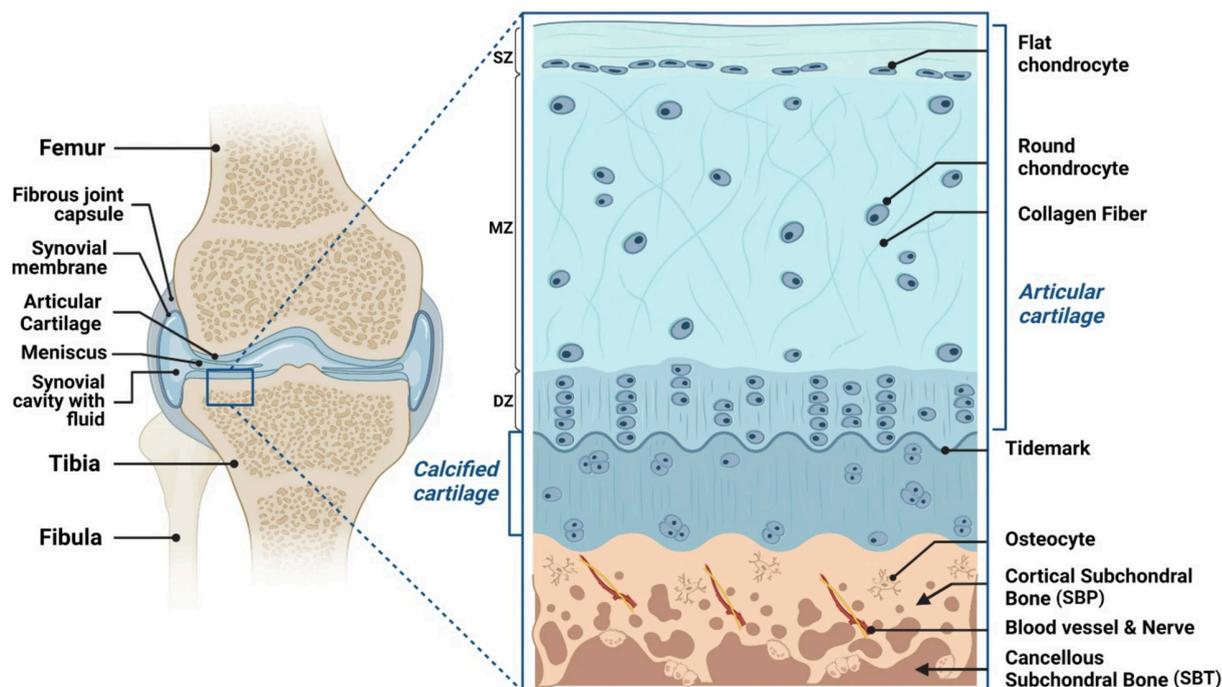


Figura 1: Esquema da estrutura histológica da articulação (Vlashi et al. 2023)

Condrócitos extraídos da cartilagem articular, quando estimulados por IL-1 β e TNF- α , diminuem a expressão de colágeno tipo II, o principal componente dos tecidos cartilagosos, e aumentam a expressão de metaloproteinasas (MMPs) (Richardson e Dodge, 2000; Sadowski e Steinmeyer, 2001). Em condições inflamatórias articulares, como artrite reumatoide e osteoartrite, os níveis de MMPs estão elevados (Guan et al., 2015; Pulik, Łukasz e Motyl, 2023). Essas enzimas são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, como colágeno e proteoglicanos, e seu aumento está associado à perda de elasticidade, degeneração articular e consequente redução da funcionalidade articular.

A expressão elevada de receptores toll-like 4 (TLR4, do inglês *toll like receptor 4*), interleucina 1-beta (IL-1 β , do inglês interleukin 1 beta) e fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*) foi observada em condrocitos extraídos de

ratos modelo de MPS e cultivados *in vitro*, assim como na cartilagem articular e no líquido sinovial de mamíferos modelo de MPS (Richardson e Dodge, 2000; Simonaro, Hanskins e Schuchman, 2001; Simonaro et al., 2008; Opoka-Winiarska et al., 2013). TLR4, componente do sistema imune inato que reconhece estruturas padrões de patógenos, estimula diretamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esse ambiente inflamatório também está associado ao aumento na expressão de metaloproteinases, incluindo MMP-2 no soro de indivíduos com MPS I (Batzios et al., 2008) e, MMP-2, MMP-9 e MMP-13 no tecido sinovial de modelos murinos de MPS I (Simonaro et al., 2008; de Oliveira et al., 2013). Este aumento na atividade proteolítica de componentes da matriz extracelular, decorrente do processo inflamatório, contribui para o desenvolvimento de osteopenia em indivíduos com MPS.

Sintomas relacionados à dor e ao desenvolvimento osteoarticular deficiente são impactados por respostas inflamatórias ao acúmulo de GAGs que ocorre na MPS, e estimulam a expansão de linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, e a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Wang e Roehrl, 2002; Gómez et al., 2015; Lund et al., 2020; Patel et al., 2023). TNF- α em níveis elevados aumenta a permeabilidade endotelial, a liberação de prostaglandinas e o recrutamento de neutrófilos, resultando em inflamação local. A ativação de macrófagos, que migram para o tecido devido ao aumento da osteopontina em resposta a citocina pró-inflamatória, prejudica a mineralização óssea e causa um quadro inflamatório permanente, limitando a função física. Além disso, esse fator contribui para a baixa estatura observada em pacientes com mucopolissacaridose ao induzir resistência ao hormônio de crescimento. (Polgreen et al., 2016).

Foi demonstrado que o acúmulo de GAGs em ossos de camundongos MPS I gera um aumento da camada cartilaginosa por diminuir a atividade da catepsina K, protease expressa principalmente em osteoclastos e com função colagenolítica. O resultado é a diminuição da reabsorção da cartilagem óssea (Winiarska et al., 2013). Em condições normais, a região cartilaginosa das placas epifisárias são substituídas por tecido ósseo ao longo do desenvolvimento até que o indivíduo atinja sua máxima estatura. Em indivíduos com MPS, os condrócitos apresentam alteração de sua morfologia pelo acúmulo de GAGs no interior dos lisossomos que ocupam grande espaço citosólico, o que gera um acúmulo de condrócitos arredondados que impedem a formação da arquitetura colunar de cartilagem

na placa de crescimento, necessária para que haja crescimento ósseo (Abreu et al., 1995; Simonaro et al., 2010).

A apoptose dos condrócitos na cartilagem articular, processo que não ocorre em condições não patológicas, é estimulada pela presença aumentada de GAGs. Os lipopolissacarídeos bacterianos são potentes indutores de apoptose por estimularem liberação de óxido nítrico em algumas células, como condrócitos, e possuem homologia estrutural com dermatan sulfato. De fato, foi observado que condrócitos cultivados sob tratamento de dermatan sulfato têm concentrações de nitrito semelhantes às células tratadas com lipopolissacarídeos bacterianos (Simonaro, Hanskins e Schuchman, 2001). Pacientes MPS I mostraram possuir maiores concentrações de desoxipiridinolinas (DPD) urinária, um indicador de reabsorção óssea que é liberado na urina devido a atividade osteoclástica (Lund et al., 2020). Gatto et al. (2012) observaram *in vitro* maior propensão a formação de osteoclastos, células digestoras de matriz óssea, devido a elevada expressão do ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL, do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) por células estromais da medula óssea de indivíduos MPS I. RANKL promove a osteoclastogênese ao se ligar ao receptor RANK presente em células precursoras mononucleares, as quais se diferenciam em osteoclastos.

Um estudo realizado por Lund et al. (2020) mediu a amplitude de movimento em pacientes MPS I. Este parâmetro mede a totalidade de movimento capaz de ser executada ao redor de uma articulação. Todos os participantes apresentavam rigidez articular em pelo menos uma articulação. Também foi comparado o nível de contratura de acordo com o tratamento recebido. De forma surpreendente, os tratados com transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) apresentaram menor grau de rigidez articular, enquanto os tratados apenas com reposição enzimática apresentavam maior acometimento. Porém, apesar do primeiro grupo incluir pacientes com a forma grave, os participantes desse último grupo apresentavam idade mais avançada, o que poderia explicar a piora da disfunção motora.

1.4 Tratamentos

As complicações osteoarticulares são comumente o primeiro sintoma apresentado em pacientes com o fenótipo Scheie e surgem em mais de 80% dos pacientes com fenótipo Scheie e Hurler-Scheie (Cimaz et al., 2006; Cimaz et al., 2009; Thomas et al., 2010). As manifestações esqueléticas típicas da MPS I são disostoses múltiplas, entre elas, mão em

garra (figura 1), malformações do quadril e da clavícula e escoliose. Como consequência do acúmulo de GAGs, ocorre o processo de fibrose da cápsula articular, que causará a limitação dos movimentos, provocando rigidez articular, podendo causar perda de função (Kuiper et al., 2019; Melbouci et al., 2018; Tomatsu et al., 2015). Esses quadro clínicos levam os pacientes a serem submetidos a uma série de tratamentos específicos, como infiltrações articulares e cirurgias ortopédicas (Taylor et al., 2008; Tomatsu et al., 2015).



Figura 2: Raio-x de mão esquerda de paciente com mucopolissacaridose tipo I (Summers e Ashworth, 2011, et. al).

Atualmente, o tratamento mais utilizado para a MPS I é a terapia de reposição enzimática (TRE) que consiste na administração semanal da forma recombinante da enzima ao paciente (Giugliani, 2012). Apesar de ser mais segura e eficiente, a enzima não é distribuída para órgãos como cérebro, ossos e cartilagens quando a via de administração é venosa (Clarke et al., 2009). Além disso, possui baixa adesão ao tratamento e custo elevado - entre 2006 e 2010 cerca de R\$ 9.200.000,00 foram distribuídos pelo Ministério da Saúde para a TRE de 24 pacientes com MPS I (Diniz, Medeiros e Schwartz, 2012), o que justifica a busca de novas estratégias para o tratamento da doença. A administração intra-articular da enzima mostrou reduzir o infiltrado de macrófagos e o acúmulo de GAGs na membrana sinovial e condrócitos, alcançando inclusive os localizados nas camadas mais

profundas da cartilagem (Wang et al., 2014). Ainda que promissora, essa abordagem não é adotada como parte do tratamento padrão oferecido pelo Sistema Único de Saúde.

Outro tratamento disponível é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), inicialmente realizado a partir da medula óssea e mais recentemente através do transplante de cordão umbilical (TCU) (Muenzer, 2011). Este tratamento permite que as células transplantadas produzam e distribuam a enzima aos diferentes órgãos através da reconstituição do sistema hematopoiético. Contudo, devido aos riscos associados à terapia, como morbidades e mortalidade causadas pela doença do enxerto contra o hospedeiro, este tratamento é indicado apenas em situações específicas, as quais incluem pacientes com a forma grave da doença e com até 2 anos de idade (Nan, Park e Maeng, 2020). Outras limitações do tratamento são a dificuldade de encontrar doadores compatíveis e a ausência de efeito sobre as deformidades ósseas e neurológicas já estabelecidas no momento do transplante (Nan, Park e Maeng, 2020). Também há pouco impacto na doença óssea, provavelmente devido à penetração deficiente da enzima nos condrócitos e a incapacidade de corrigir ou substituir os osteócitos (van der Linden, 2011; Tomatsu et al., 2015).

Os tratamentos disponíveis para a MPS I apresentam limitações clínicas, fazendo-se necessária a busca por novas terapias que possuam eficácia em todo o quadro clínico da doença. Por esse motivo, tem-se buscado novas terapias, dentre as quais a terapia gênica (Poletto, Baldo e Gomez-ospina, 2020), que consiste na inserção de um gene funcional, a fim de corrigir uma disfunção celular, ou prover novas funções, com a introdução do material genético diretamente nas células do paciente (*in vivo*), ou a partir da administração das células após modificação *in vitro* (*ex vivo*).

1.5 Edição gênica

Uma alternativa de terapia gênica é a edição gênica utilizando o sistema CRISPR-Cas9 (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) tipo II advindo de *Streptococcus pyogenes* (Le Rhun et al., 2019; Xu e Li, 2020). Essa plataforma provém de um mecanismo imune adaptativo de defesa de procariotos, onde o loco CRISPR incorpora o genoma de elementos genéticos invasores (i.e., bacteriófagos, transposons e plasmídeos), criando uma memória genética que será usada em uma reinvasão. A Cas9 é uma nuclease que cliva o DNA do invasor. Deste modo, esse sistema pode ser utilizado para clivar o DNA em um ponto específico e inserir uma nova sequência de interesse e assim corrigir a mutação. O sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado por

transfecção simples de um plasmídeo de expressão de RNA guia (gRNA ou sgRNA) e de Cas9 humanizado em células mamíferas, transformando-se numa ferramenta promissora para várias aplicações (Poletto, Baldo e Gomez-ospina, 2020).

O gRNA, com um comprimento de aproximadamente 20 ribonucleotídeos, é personalizado de acordo com a sequência-alvo de clivagem e mimetiza as funções do RNA CRISPR variável (crRNA) e do crRNA transativador (tracrRNA) em procariotos. O primeiro atua no reconhecimento do fragmento de DNA alvo e, o segundo, interage com a Cas9. Para que ocorra clivagem do DNA, é necessário que haja um motivo adjacente do protoespaçador (PAM) à jusante do sítio de interesse, composto por 2 a 5 nucleotídeos, responsável por ancorar a endonuclease ao sítio de interesse. Em seguida, na montante região PAM há separação da dupla fita de DNA e interação do sgRNA com DNA genômico, resultando na clivagem de dupla fita de DNA que ocorre a uma distância de 3 a 4 pares de bases de PAM (Jinek et al., 2018; Anders et al., 2014; Cong et al., 2013). Neste momento, através do recrutamento do mecanismo endógeno de reparo direcionado por homologia (HDR - *Homology-directed repair*), que ocorre no final das fases S e G2 do ciclo celular, é realizada a introdução do transgene (DNA doador) que é flanqueado por sequências homólogas à região do sítio da quebra dupla de fitas no genoma (Heyer, Ehmsen e Liu J., 2010).

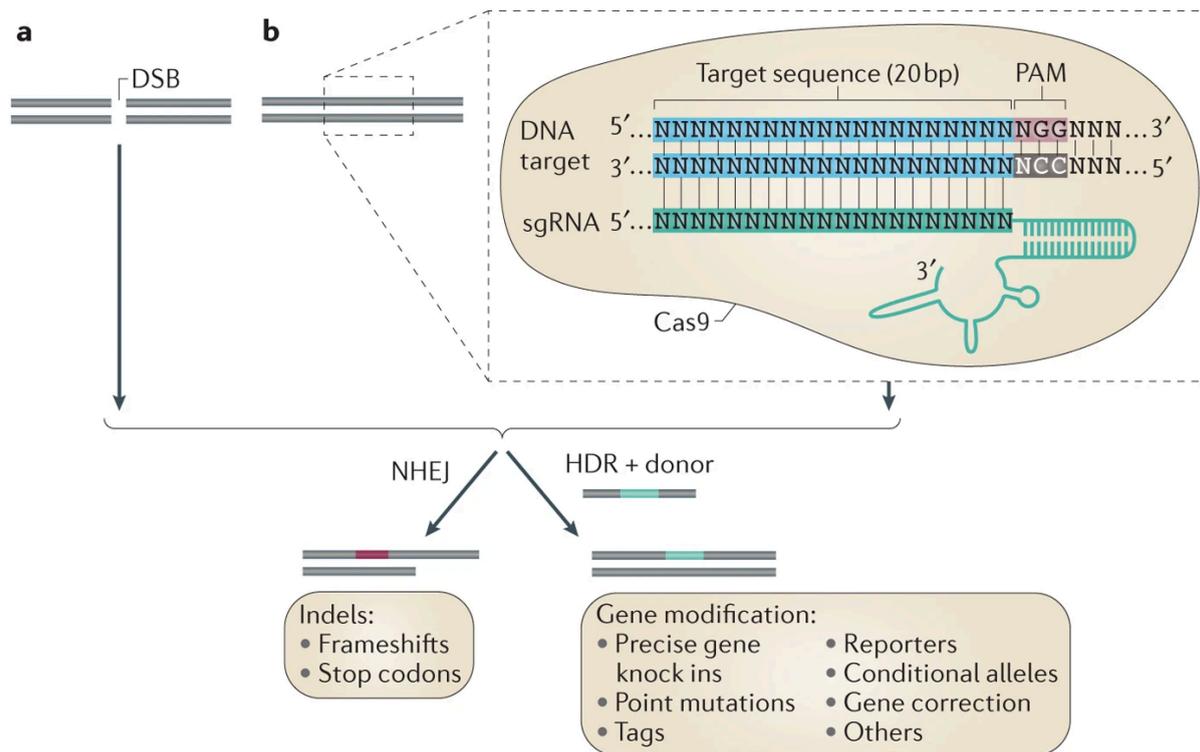


Figura 3: Mecanismos de reparo celular após quebra de fita dupla de DNA pelo sistema CRISPR-Cas9 (Sánchez-Rivera e Jacks, 2015).

No presente estudo, optamos pela realização da edição gênica através do sistema CRISPR-Cas9 utilizando dois plasmídeos. O primeiro possui a sequência da Cas9 sob controle do promotor EF1 α , que possui nível de expressão médio na maioria dos tipos celulares, e está à montante da sequência WPRE (*Woodchuck virus post-transcriptional regulatory element*), responsável por conferir maior estabilidade ao mRNA e aumentar sua expressão. Possui também a sequência do gRNA sob o promotor H1 de polimerase III e é complementar à 20 nucleotídeos presentes no sítio de clivagem do locus *ROSA26*, um locus seguro para inserção de transgene comumente utilizado em murinos. O plasmídeo também contém sequência NLSs (*nuclear localization signal*), necessário para que a Cas9 seja transportada para o núcleo, onde desempenha sua atividade como endonuclease. O segundo plasmídeo utilizado no estudo possui o cDNA do gene *Idua* utilizado como sequência doadora durante o HDR, flanqueado por regiões (ARM1 e ARM2) homólogas ao sítio de clivagem da Cas9 no locus *ROSA26*. O gene *IDUA* está sob controle do promotor EF1 α .

Para a administração do sistema CRISPR-Cas9, visando terapia gênica da MPS I, algumas vias têm sido propostas e resultados distintos podem ser obtidos conforme a escolha adotada. Foi demonstrado recentemente que a administração de nanoemulsões catiônicas peguiladas associadas ao sistema CRISPR-Cas9 e a um plasmídeo doador do gene *IDUA* (pIDUA) aumentou a expressão gênica e a produção funcional de enzimas em fibroblastos humanos *in vitro* e *in vivo* em camundongos MPS I, após a entrega intravenosa (Schuh et al., 2018a; Schuh et al., 2020), com alta viabilidade celular e tolerabilidade *in vivo*. No entanto, os tecidos que são de difícil acesso, como ossos e articulações, não apresentam melhoras através das vias de administração intravascular ou nasal, pois com a administração sistêmica, nem o tratamento nem a enzima são capazes de penetrar nesses tecidos (Schuh.; Baldo; Teixeira, 2016; Schuh et al., 2018b).

A utilização de vetores para entrega de ácidos nucleicos em tecidos biológicos permite que moléculas de DNA mantenham sua estabilidade frente à atividade de nucleases do hospedeiro e seja entregue ao interior celular. Vetores não-virais apresentam capacidade de carregar grande quantidade de material genético, baixa imunogenicidade, e produção menos custosa quando comparados com vetores virais. Os sistemas poliméricos são constituídos por nanoesferas, completamente preenchidas com material polimérico, e nanocápsulas, que possuem núcleo oleoso. Lipossomas e nanoemulsões são sistemas lipídicos capazes de carregar material genético após incorporação de um lipídio catiônico que interage eletrostaticamente com grupamentos fosfato do esqueleto dos ácidos nucleicos e os protege da ação de endonucleases (Zhao et al., 2023; Zapolnik e Pyrkosz, 2022). Os lipossomas, constituídos principalmente de fosfolipídios, carregam ácidos nucleicos tanto interiormente quanto em sua superfície, enquanto em nanoemulsões, a adsorção ocorre apenas na interface (Schuh, Baldo e Teixeira, 2016). A nanoemulsão catiônica projetada para a entrega de plasmídeos é uma dispersão de óleo e água estabilizada por um surfactante que após passar por processo de homogeneização a alta pressão gera partículas coloidais de 50 a 200 nanômetros (Liu e Yu, 2010). Tais partículas coloidais apresentam alta interação com membranas biológicas (i.e., elevada capacidade fusogênica) (Liu e Yu, 2010) e quando comparados com lipossomas, nanoemulsões apresentam a vantagem de menor agregação de suas nanoestruturas em material biológico (Teixeira et al., 2017).

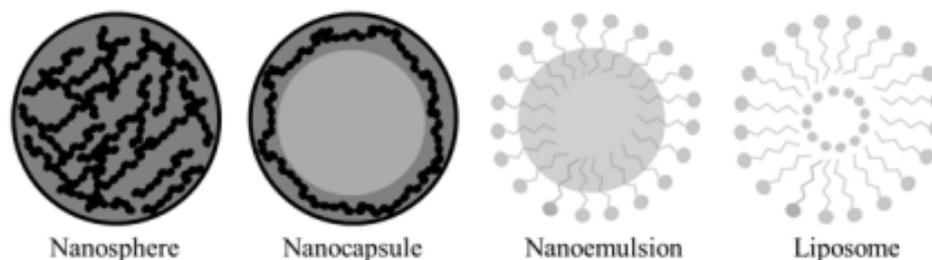


Figura 4: Representação simplificada de nanovetores tecnológicos (Schuh, Baldo e Teixeira, 2016).

A administração das nanoestruturas por via intra-articular poderia diminuir o acúmulo de GAGs nas articulações, grave problema que limita os movimentos dos pacientes com MPS I. Tal abordagem terapêutica já tem sido utilizada em modelos animais, com resultados bastante promissores, demonstrando redução do acúmulo de GAGs em até 60% ao término do tratamento (Auclair et al., 2006, Auclair et al. 2007; Wang et al., 2014) em estratégias de terapia gênica convencional. O trabalho realizado por Bidone et al. (2018) visando a redução ou prevenção das complicações ortopédicas características da MPS I, utilizou terapia gênica intra-articular em camundongos com MPS I. Esse método demonstrou segurança do tratamento, maior expressão gênica e atividade da IDUA no líquido sinovial, porém, essa atividade não foi duradoura, pois o plasmídeo utilizado não editou o genoma.

Em projeto prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, testamos uma formulação lipossomal contendo os plasmídeos do sistema CRISPR-Cas9 e doador e obtivemos resultados positivos (ainda não publicados). Baseados nisso, desenvolvemos uma formulação nanoemulsionada catiônica contendo os mesmos plasmídeos e um anti-inflamatório esteroidal, que possui ação tanto na produção da enzima deficiente quanto no tratamento dos sintomas inflamatórios das MPS. A formulação consiste em uma nanoemulsão composta por fosfolipídios de lecitina de gema de ovo, um lipídio catiônico, essencial para a complexação com os ácidos nucleicos, um lipídio furtivo, um lipídio fusogênico e um hidrogel polimérico termorresponsivo, que permite a liberação controlada no interior do ambiente articular. O núcleo da gotícula é composto por triglicerídeos de cadeia média que possibilitam a dispersão do anti-inflamatório esteroide dexametasona.

A dexametasona exerce seus efeitos através de múltiplos mecanismos, incluindo: (1) inibição dos fatores de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*) e NFκB que regulam positivamente a expressão de diversas citocinas pró inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e TNF-α; (2) inibição da enzima fosfolipase-2, envolvida na ativação de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos; (3) regulação positiva da citocina anti-inflamatória IL-10 (Ray e Prefontaine, 1994; Verhoef, 1999; Richardson e Dodge, 2003; Stone, Malanga e Capella, 2021). O agente anti-inflamatório demonstra eficácia na reversão do aumento de MMP-1, MMP-3 e MMP-13, bem como na restauração da diminuição do colágeno II em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF-α, mimetizando as condições do ambiente articular inflamado (Richardson e Dodge, 2003; Sadowski e Steinmeyer, 2001; Lu, Evans e Grodzinsky, 2011). Além disso, sua administração intra-articular em modelos murinos de artrite induzida resulta na redução dos níveis de NF-κB e MMP-13, mitigando a degeneração articular (Tsao et al., 1997; Formica, Barreto e Zenobi-Wang, 2019; Wang et al., 2021).

Quando administrada livre no interior da articulação, observa-se diminuição do tempo de permanência no sítio devido a drenagem pela vasculatura linfática, o que demanda doses repetidas, diminuindo sua eficácia frente ao surgimento de efeitos indesejáveis como diminuição da camada cartilaginosa e redução do efeito analgésico (Black e Grodzinsky, 2019). Para otimizar a permanência do princípio ativo no sítio alvo foram desenvolvidos sistemas de liberação controlada. Neste contexto, hidrogéis termorresponsivos, como poloxâmero 407, são veículos ideais para a entrega intra-articular de dexametasona, ajustando sua viscosidade em resposta à temperatura corporal, o que permite retenção controlada do fármaco e sua liberação gradual (Wang et al., 2021; Chen et al., 2024).

Espera-se promover uma maior eficiência de edição gênica na administração intra-articular do gene da enzima deficiente combinado com a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para fins de edição gênica para inserção de sequência do gene *Idua* no locus *ROSA 26* em genoma de camundongos MPS I. Uma vez que entre 5% e 20% das enzimas lisossomais produzidas em uma célula são liberadas do citoplasma e endocitadas por outras células, a inserção do gene codificador da IDUA em uma pequena fração de sinoviócitos pode fornecer quantidades de enzima suficientes para melhoria dos sintomas devido à denominada correção cruzada, em especial em um ambiente limitado como a articulação

(Penati et al., 2017). Além disso, a maioria das doenças articulares, com exceção das que possuem etiologia autoimune, afetam pequeno número de articulação, sendo viável a injeção intra-articular apenas nas regiões afetadas (Evans, Ghivizzani e Robbins, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e a eficiência de transfeccção *in vitro* em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (*FLS - fibroblast like synoviocytes*) de camundongos MPS I e *in vivo* em camundongos MPS I de uma formulação nanotecnológica co-carreadora do plasmídeo do sistema CRISPR-Cas9, do plasmídeo doador da sequência codificante do gene *IDUA* e um antiinflamatório esteróide.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar FLS de camundongos MPS I;
- Avaliar *in vitro* em FLS de camundongos MPS I a citotoxicidade e a eficiência de transfeccção dos tratamentos;
- Avaliar a segurança tópica dos tratamentos através de ensaio HET-CAM;
- Avaliar *in vivo* a segurança e eficiência de transfeccção da administração dos complexos em camundongos MPS I nocautes para o gene *IDUA* através da injeção intra-articular;
- Avaliar marcadores de inflamação no soro dos animais;
- Realizar análise histológica para avaliação do comprometimento articular nos diferentes grupos.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados sob a forma de artigo científico a ser submetido para a revista *International Journal of Pharmaceutics*, com figuras e tabelas distribuídas ao longo do texto para facilitar a leitura.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, avaliamos a segurança e eficácia da administração intra-articular do sistema CRISPR-Cas9 - para inserção do gene *Idua* - e do anti-inflamatório esteroide dexametasona em nanoemulsão catiônica em articulação camundongos modelo de MPS I. As formulações foram avaliadas *in vitro* em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS - *fibroblast like synoviocytes*) de camundongos MPS I. O ensaio MTT não demonstrou citotoxicidade das formulações e o tratamento das células com um lipídeo fluorescente mostrou sua eficiência de transfecção em análise de microscopia. A segurança tópica do ensaio HET-CAM mostrou que a nanoemulsão revestida com poloxamer foi levemente irritante e a nanoemulsão revestida com poloxamer contendo dexametasona em seu núcleo lipídico foi moderadamente irritante. A administração dos complexos em camundongos MPS I nocautes para o gene IDUA através da injeção intra-articular foi realizada de forma segura e após uma semana detectou-se aumento da atividade enzimática apenas no líquido sinovial de animais tratados. Os níveis de IL-6 no líquido sinovial estavam diminuídos nos animais tratados com a formulação, mas não foi observada diferença na análise histológica.

Dos testes de avaliação de segurança *in vitro*, pretende-se incluir o iodeto de propídeo em citometria de fluxo para avaliação de necrose em FLS pós-tratamento para complementar os resultados obtidos no MTT que informam a atividade metabólica celular. Em relação à transfecção *in vitro*, pretendemos investigar o acúmulo de GAGs que aumenta os lisossomos em tamanho e em quantidade. O efeito do tratamento na organela pode ser visualizado em microscopia confocal ao aplicar reagente fluorescente marcador de lisossomos em FLS após a transfecção. A diminuição dos lisossomos reflete a digestão de GAGs em seu interior, que ocorre quando há atividade enzimática, e portanto, produção de IDUA em células MPS I.

Pretendemos avaliar os efeitos da terapia gênica a longo prazo a fim de verificar por quanto tempo a expressão de IDUA é sustentada e se há diminuição dos níveis de GAGs, que não foram dosados neste estudo pois não se espera oscilações significativas de DS e HS em uma semana após o tratamento. A diminuição das concentrações de GAGs é de extrema importância para a melhora dos sintomas, visto que seu acúmulo em vacúolos celulares parece induzir apoptose, desregular o processo de autofagia de condrócitos, uma das causas de destruição articular, além de contribuir para a desorganização da placa de crescimento (Simonaro et al., 2001; Jiang et al., 2020). Ainda, pretendemos avaliar a

eficiência de edição gênica com a Cas9 e incorporação do gene doador no genoma após HDR através da quantificação de cópias de *IDUA* no DNA genômico por PCR em tempo real.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa de atividade de *IDUA* em soro entre tratados com terapia gênica e dexametasona e os que receberam salina, o que corrobora a hipótese de que a nanoemulsão revestida com poloxamero desenvolvida é um bom candidato para o carreamento de fármacos no interior do ambiente articular pois supre os critérios necessários para que uma molécula tenha seu efeito terapêutico: alta retenção articular e baixa depuração do fármaco. Embora os prejuízos do acúmulo de HS e DS sejam sistêmicos, neste estudo, buscamos avaliar os efeitos de um fármaco que se propõe a tratar especificamente da sintomatologia osteoarticular da MPS I. Na prática clínica, entretanto, objetiva-se melhorar a qualidade de vida do paciente de forma global, e uma estratégia para esse fim seria a combinação de terapia gênica sistêmica, de administração venosa, como realizado por Schuh et al. (2019, 2020), associada à administração *in situ*. A terapia gênica aplicada sistemicamente beneficia a maioria dos órgãos vascularizados através da internalização da enzima *IDUA* circulante através de receptor M6F (Hartung et al, 1999; Hollak e Wijburg, 2014) mas, é necessário o desenvolvimento de drogas que tenham propriedades físico-químicas e reológicas ideais para a administração *in situ* em sítios não acessíveis, como articulações e sistema nervoso.

Apesar de termos obtido resultados *in vitro* e de eletroforese do efeito da adição de poloxamero antes e após a contato dos plasmídeos com nanoemulsão (PNE e NEP, respectivamente), os animais *in vivo* foram tratados somente com nanoemulsão com revestimento feito posterior à adição de plasmídeos (PNE). Isto ocorreu porque hipotetizamos que o poloxamero revestindo a nanoemulsão poderia diminuir a interação eletrostática do lipídeo catiônico DOTAP com a molécula de DNA e interferir em sua adsorção, no entanto, não foi observada diferença quando comparamos os diferentes métodos de preparação *in vitro*.

A IL-6 foi dosada em líquido sinovial para avaliar o impacto do tratamento no grau de inflamação, mas, outros marcadores serão dosados, como IL-1 β , TNF- α e TGF- β , alterados em doenças articulares degenerativas como artrite reumatoide e também alteradas em MPS, já que ambas doenças apresentam perfil similar de alterações patobioquímicas (Simonaro et al., 2015). Outro aspecto relevante na avaliação do nível do

comprometimento osteoarticular é a dosagem de biomarcadores que indicam destruição óssea, como deoxipiridinolina e a piridinolina (DPD e PYD, respectivamente) essenciais na degradação de colágeno tipo I e liberados na urina quando há reabsorção óssea (Stevenson et al., 2015, Shetty et al., 2016; Lund et al. 2020). Seus níveis urinários elevados podem indicar excesso de reabsorção da matriz óssea, que torna os ossos mais quebradiços e propensos a fraturas. A vantagem da dosagem de DPD e PYD urinárias é o acompanhamento de seus níveis ao longo do tempo pós tratamento, já que sua coleta pode ser feita repetidas vezes ao longo do tempo e é facilmente obtida por não se tratar de um procedimento invasivo.

A aplicação de teste comportamental pode ser utilizada para aferir o nível de dor na articulação inflamada que recebeu a administração intra-articular a fim de acompanhar o início do alívio dos sintomas após o tratamento. O teste de limiar de dor por pressão (*Pressure Pain Threshold*) utiliza a mínima pressão aplicada na articulação alvo em que o animal reage com reflexos de flexão ou vocalização como medida do nível de dor local (Ishikawa et al., 2019; Wang et al., 2020). A atividade locomotora diminuída também é um indício de dor inflamatória, e pode ser observada através do teste de campo aberto que traça quantas vezes o animal cruza determinado número de linhas durante um tempo limitado. Informações sobre o impacto do tratamento no nível de dor e de mobilidade dos camundongos MPS I são parâmetros que ajudam a compreender se há melhora das principais queixas clínicas articulares trazidas pela maioria dos pacientes com MPS I.

REFERÊNCIAS

Abreu S, Hayden J, Berthold P, et al. Growth plate pathology in feline mucopolysaccharidosis VI. *Calcif Tissue Int.* 1995;57(3):185-190. doi:10.1007/BF00310256

Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014;513(7519):569-573. doi:10.1038/nature13579

Auclair D, Hein LK, Hopwood JJ, Byers S. Intra-articular enzyme administration for joint disease in feline mucopolysaccharidosis VI: enzyme dose and interval. *Pediatr Res.* 2006;59(4 Pt 1):538-543. doi:10.1203/01.pdr.0000203090.41012.a6

Auclair D, Hopwood JJ, Lemontt JF, Chen L, Byers S. Long-term intra-articular administration of recombinant human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase in feline mucopolysaccharidosis VI. *Mol Genet Metab.* 2007;91(4):352-361. doi:10.1016/j.ymgme.2007.04.009

Batzios SP, Zafeiriou DI, Vargiami E, Karakiulakis G, Papakonstantinou E. Differential expression of matrix metalloproteinases in the serum of patients with mucopolysaccharidoses. *JIMD Rep.* 2012;3:59-66. doi:10.1007/8904_2011_58

Bidone J, Schuh RS, Farinon M, et al. Intra-articular nonviral gene therapy in mucopolysaccharidosis I mice. *Int J Pharm.* 2018;548(1):151-158. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.049

Black R, Grodzinsky AJ. Dexamethasone: chondroprotective corticosteroid or catabolic killer?. *Eur Cell Mater.* 2019;38:246-263. Published 2019 Nov 22. doi:10.22203/eCM.v038a17

Brannan SR, Jerrard DA. Synovial fluid analysis. *J Emerg Med.* 2006;30(3):331-339. doi:10.1016/j.jemermed.2005.05.029

Campos, D., Monaga, M. Mucopolysaccharidosis type I: current knowledge on its pathophysiological mechanisms. *Metab Brain Dis* 27, 121–129 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9302-1>

Çelik B, Tomatsu SC, Tomatsu S, Khan SA. Epidemiology of Mucopolysaccharidoses Update. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(2):273. Published 2021 Feb 10. doi:10.3390/diagnostics11020273

Chen N, Wei X, Zhao G, et al. Single dose thermoresponsive dexamethasone prodrug completely mitigates joint pain for 15 weeks in a murine model of osteoarthritis. *Nanomedicine.* 2024;57:102735. doi:10.1016/j.nano.2024.102735

Cimaz R, Vijay S, Haase C, et al. Attenuated type I mucopolysaccharidosis in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis: a series of 13 patients with Scheie syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(2):196-202

Cimaz R, Coppa GV, Koné-Paut I, et al. Joint contractures in the absence of inflammation may indicate mucopolysaccharidosis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2009;7:18. Published 2009 Oct 23. doi:10.1186/1546-0096-7-18

Clarke LA. Mucopolysaccharidosis Type I. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; October 31, 2002.

Clarke LA, Wraith JE, Beck M, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*. 2009;123(1):229-240. doi:10.1542/peds.2007-3847

Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143

de Oliveira PG, Baldo G, Mayer FQ, et al. Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(5):305-311. doi:10.1111/iep.12033

Diniz D, Medeiros M, Schwartz IV. Consequências da judicialização das políticas de saúde: custos de medicamentos para as mucopolissacaridoses [Consequences of the judicialization of health policies: the cost of medicines for mucopolysaccharidosis]. *Cad Saude Publica*. 2012;28(3):479-489. doi:10.1590/s0102-311x2012000300008

Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther*. 2018;29(1):2-14. doi:10.1089/hum.2017.181

Fecarotta S, Tarallo A, Damiano C, Minopoli N, Parenti G. Pathogenesis of Mucopolysaccharidoses, an Update. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2515. Published 2020 Apr 4. doi:10.3390/ijms21072515

Formica FA, Barreto G, Zenobi-Wong M. Cartilage-targeting dexamethasone prodrugs increase the efficacy of dexamethasone. *J Control Release*. 2019;295:118-129. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.025

Fujitsuka H, Sawamoto K, Peracha H, et al. Biomarkers in patients with mucopolysaccharidosis type II and IV. *Mol Genet Metab Rep*. 2019;19:100455. Published 2019 Feb 5. doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100455

Gatto F, Redaelli D, Salvadè A, et al. Hurler disease bone marrow stromal cells exhibit altered ability to support osteoclast formation. *Stem Cells Dev*. 2012;21(9):1466-1477. doi:10.1089/scd.2011.0555

Giugliani R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(5):871-877. doi:10.1007/s10545-011-9436-z

Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis--finding targets for candidate DMOADs. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(3):159-170. doi:10.1038/nrrheum.2014.209

Gonzalez EA, Martins GR, Tavares AMV, et al. Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in mucopolysaccharidosis I mice. *Life Sci*. 2018;196:102-109. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.020

Guan PP, Guo JW, Yu X, et al. The role of cyclooxygenase-2, interleukin-1 β and fibroblast growth factor-2 in the activation of matrix metalloproteinase-1 in sheared-chondrocytes and articular cartilage. *Sci Rep*. 2015;5:10412. Published 2015 May 20. doi:10.1038/srep10412

Hampe CS, Eisengart JB, Lund TC, Orchard PJ, Swietlicka M, Wesley J, McIvor RS. Mucopolysaccharidosis Type I: A Review of the Natural History and Molecular Pathology. *Cells*. 2020; 9(8):1838. <https://doi.org/10.3390/cells9081838>

Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113-139. doi:10.1146/annurev-genet-051710-150955

Huang H, Lou Z, Zheng S, et al. Intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy: shifting from sustained release to enhancing penetration into cartilage. *Drug Deliv*. 2022;29(1):767-791. doi:10.1080/10717544.2022.2048130

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829

Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(13):3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>

Kubaski F, de Oliveira Poswar F, Michelin-Tirelli K, et al. Mucopolysaccharidosis Type I. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):161. Published 2020 Mar 16. doi:10.3390/diagnostics10030161

Kuiper GA, Langereis EJ, Breyer S, et al. Treatment of thoracolumbar kyphosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of an international consensus procedure. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):17. Published 2019 Jan 18. doi:10.1186/s13023-019-0997-5

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):397-411. doi:10.1038/nri3452

Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biol*. 2019;16(4):380-389. doi:10.1080/15476286.2019.1582974

Liu CH, Yu SY. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;79(2):509-515. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.05.026

Lu YC, Evans CH, Grodzinsky AJ. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R142. doi:10.1186/ar3456

Lund TC, Doherty TM, Eisengart JB, et al. Biomarkers for prediction of skeletal disease progression in mucopolysaccharidosis type I. *JIMD Rep*. 2020;58(1):89-99. Published 2020 Dec 8. doi:10.1002/jmd2.12190

Martins AM, Dualibi AP, Norato D, et al. Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J Pediatr*. 2009;155(4 Suppl):S32-S46. doi:10.1016/j.jpeds.2009.07.005

Matte U, Yogalingam G, Brooks D, et al. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol. Genet. Metab*. 2003;78. doi:10.1016/S1096-7192(02)00200-7

Maudens P, Jordan O, Allémann E. Recent advances in intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy. *Drug Discov Today*. 2018;23(10):1761-1775. doi:10.1016/j.drudis.2018.05.023

Maudens P, Jordan O, Allémann E. Recent advances in intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy. *Drug Discov Today*. 2018;23(10):1761-1775. doi:10.1016/j.drudis.2018.05.023

Melbouci M, Mason RW, Suzuki Y, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Growth impairment in mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab*. 2018;124(1):1-10. doi:10.1016/j.ymgme.2018.03.004

Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA; International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics*. 2009;123(1):19-29. doi:10.1542/peds.2008-0416 ,

Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50 Suppl 5:v4-v12. doi:10.1093/rheumatology/ker394

Nan H, Park C, Maeng S. Mucopolysaccharidoses I and II: Brief Review of Therapeutic Options and Supportive/Palliative Therapies. *Biomed Res Int*. 2020;2020:2408402. Published 2020 Dec 4. doi:10.1155/2020/2408402

Neufeld, EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses BT - The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. In: SCRIVER, C et al. (org.). New York: Mc Graw Hill, 2001.

Neufeld EF, Muenzer J. The online metabolic and molecular basis of inherited disease. In: Valle D, Beaudet A L, Vogelstein B (org.). New York: MacGrow Hill, 2007.

- Opoka-Winiarska V, Jurecka A, Emeryk A, Tylki-Szymańska A. Osteoimmunology in mucopolysaccharidoses type I, II, VI and VII. Immunological regulation of the osteoarticular system in the course of metabolic inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(12):1813-1823. doi:10.1016/j.joca.2013.08.001
- Parker H, Bigger BW. The role of innate immunity in mucopolysaccharide diseases. *J Neurochem*. 2019;148(5):639-651. doi:10.1111/jnc.14632
- Patel JP, Konanur Srinivasa NK, Gande A, Anusha M, Dar H, Baji DB. The Role of Biologics in Rheumatoid Arthritis: A Narrative Review. *Cureus*. 2023;15(1):e33293. Published 2023 Jan 3. doi:10.7759/cureus.33293
- Penati R, Fumagalli F, Calbi V, Bernardo ME, Aiuti A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I. *J Inher Metab Dis*. 2017;40(4):543-554. doi:10.1007/s10545-017-0052-4
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*. 2012;199(5):723-734. doi:10.1083/jcb.201208152
- Poletto E, Baldo G, Gomez-Ospina N. Genome Editing for Mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):500. Published 2020 Jan 13. doi:10.3390/ijms21020500
- Poletto E, Pasqualim G, Giugliani R, Matte U, Baldo G. Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants. *Clin Genet*. 2018;94(1):95-102. doi:10.1111/cge.13224
- Polgreen LE, Vehe RK, Rudser K, et al. Elevated TNF- α is associated with pain and physical disability in mucopolysaccharidosis types I, II, and VI. *Mol Genet Metab*. 2016;117(4):427-430. doi:10.1016/j.ymgme.2016.01.012
- Pulik Ł, Łęgosz P, Motyl G. Matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a state of the art review. *Reumatologia*. 2023;61(3):191-201. doi:10.5114/reum/168503
- Ralphs JR, Benjamin M. The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. *J Anat*. 1994;184 (Pt 3)(Pt 3):503-509
- Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):752-756. doi:10.1073/pnas.91.2.752
- Richardson DW, Dodge GR. Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res*. 2003;52(1):39-49. doi:10.1007/s000110300012

Richardson DW, Dodge GR. Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res.* 2000;61(6):624-630. doi:10.2460/ajvr.2000.61.624

Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(5):407-415. doi:10.1053/joca.2000.0406

Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):387-395. doi:10.1038/nrc3950

Schuh, RS et al. In vivo genome editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, Netherlands,* v. 288, p. 23–33, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.031>

Schuh RS, Bidone J, Poletto E, et al. Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as Nucleic Acids Delivery Systems Aiming at Mucopolysaccharidosis Type I Gene Therapy. *Pharm Res.* 2018b;35(11):221. Published 2018 Sep 26. doi:10.1007/s11095-018-2503-5

Schuh RS, Baldo G, Teixeira HF. Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(12):1709-1718. doi:10.1080/17425247.2016.1202235

Schuh RS, Gonzalez EA, Tavares AMV, et al. Neonatal nonviral gene editing with the CRISPR/Cas9 system improves some cardiovascular, respiratory, and bone disease features of the mucopolysaccharidosis I phenotype in mice. *Gene Ther.* 2020;27(1-2):74-84. doi:10.1038/s41434-019-0113-4

Simonaro CM, D'Angelo M, He X, et al. Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *Am J Pathol.* 2008;172(1):112-122. doi:10.2353/ajpath.2008.070564

Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH. Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest.* 2001;81(9):1319-1328. doi:10.1038/labinvest.3780345

Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E, He X, Jepsen KJ, Schuchman EH. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF-alpha antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):222-227. doi:10.1073/pnas.0912937107

Stone S, Malanga GA, Capella T. Corticosteroids: Review of the History, the Effectiveness, and Adverse Effects in the Treatment of Joint Pain. *Pain Physician.* 2021;24(S1):S233-S246.

Summers CG, Ashworth JL. Ocular manifestations as key features for diagnosing mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50 Suppl 5:v34-v40. doi:10.1093/rheumatology/ker392

Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0

Taylor C, Brady P, O'Meara A, Moore D, Dowling F, Fogarty E. Mobility in Hurler syndrome. *J Pediatr Orthop*. 2008;28(2):163-168. doi:10.1097/BPO.0b013e3181649e25

Teixeira HF, Bruxel F, Fraga M, et al. Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. *Int J Pharm*. 2017;534(1-2):356-367. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.10.030

Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med*. 2003;5(4):286-294. doi:10.1097/01.GIM.0000078027.83236.49

Thomas JA, Beck M, Clarke JT, Cox GF. Childhood onset of Scheie syndrome, the attenuated form of mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(4):421-427. doi:10.1007/s10545-010-9113-7

Tomatsu S, Alméciga-Díaz CJ, Montaña AM, et al. Therapies for the bone in mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab*. 2015;114(2):94-109. doi:10.1016/j.ymgme.2014.12.001

Tsao PW, Suzuki T, Totsuka R, et al. The effect of dexamethasone on the expression of activated NF-kappa B in adjuvant arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;83(2):173-178. doi:10.1006/clin.1997.4333

van der Linden MH, Kruyt MC, Sakkars RJ, de Koning TJ, Oner FC, Castelein RM. Orthopaedic management of Hurler's disease after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(3):657-669. doi:10.1007/s10545-011-9304-x

Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Lafeber FP, Bijlsma JW. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(1):49-54. doi:10.1136/ard.58.1.49

Vlashi R, Zhang X, Li H, Chen G. Potential therapeutic strategies for osteoarthritis via CRISPR/Cas9 mediated gene editing [published correction appears in *Rev Endocr Metab Disord*. 2023 Dec 22;:]. *Rev Endocr Metab Disord*. Published online December 6, 2023. doi:10.1007/s11154-023-09860-y

Wang JY, Roehrl MH. Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14362-14367. doi:10.1073/pnas.222536599

Wang QS, Xu BX, Fan KJ, Fan YS, Teng H, Wang TY. Dexamethasone-loaded thermo-sensitive hydrogel attenuates osteoarthritis by protecting cartilage and providing effective pain relief. *Ann Transl Med*. 2021;9(14):1120. doi:10.21037/atm-21-684

Wang RY, Aminian A, McEntee MF, et al. Intra-articular enzyme replacement therapy with rhIDUA is safe, well-tolerated, and reduces articular GAG storage in the canine model of mucopolysaccharidosis type I. *Mol Genet Metab*. 2014;112(4):286-293. doi:10.1016/j.ymgme.2014.05.015

Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, et al. Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One*. 2012;7(4):e35787. doi:10.1371/journal.pone.0035787

Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:2401-2415. Published 2020 Sep 8. doi:10.1016/j.csbj.2020.08.031

Yokota K, Sato K, Miyazaki T, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6-Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2021;73(7):1145-1154. doi:10.1002/art.41666

Zapolnik P, Pyrkosz A. Nanoemulsions as Gene Delivery in Mucopolysaccharidosis Type I-A Mini-Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):4785. Published 2022 Apr 26. doi:10.3390/ijms23094785

Zhao T, Li X, Li H, et al. Advancing drug delivery to articular cartilage: From single to multiple strategies. *Acta Pharm Sin B*. 2023;13(10):4127-4148. doi:10.1016/j.apsb.2022.11.021