

Efeito de complexos pIDUA/nanoemulsões peguiladas sobre a atividade da enzima alfa-L-iduronidase em cérebro e articulações de camundongos MPS I.

Giordano Avancini Solé¹, Helder Teixeira¹
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença genética, caracterizada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), o que resulta no acúmulo de glicosaminoglicanos nos lisossomos. Como consequência diversas manifestações clínicas, como problemas neurológicos e de mobilidade, são observadas nos pacientes. É uma doença que não possui cura e os tratamentos disponíveis apresentam restrições. Como abordagem terapêutica a terapia gênica não-viral utilizando vetores lipídicos tem sido proposta à MPS I.

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com nanoemulsões catiônicas peguiladas como carreadores para o plasmídeo pIDUA, o qual expressa o gene de IDUA.

Objetivo

Avaliar a transfecção de complexos formados por nanoemulsões catiônicas peguiladas contendo pIDUA, pelas vias de administração intra-nasal e intra-articular.

Metodologia

As nanoemulsões catiônicas foram compostas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média (TCM), estabilizado por uma mistura do lipídeo catiônico DOTAP, e os fosfolídeos DOPE e DPSPE-PEG, sendo obtidas pelo procedimento de homogeneização à alta pressão. As formulações contendo pIDUA foram obtidas por adsorção extemporânea do plasmídeo (NE_A) ou por encapsulamento (NE_E), na razão de cargas +4/- (Fig. 1).

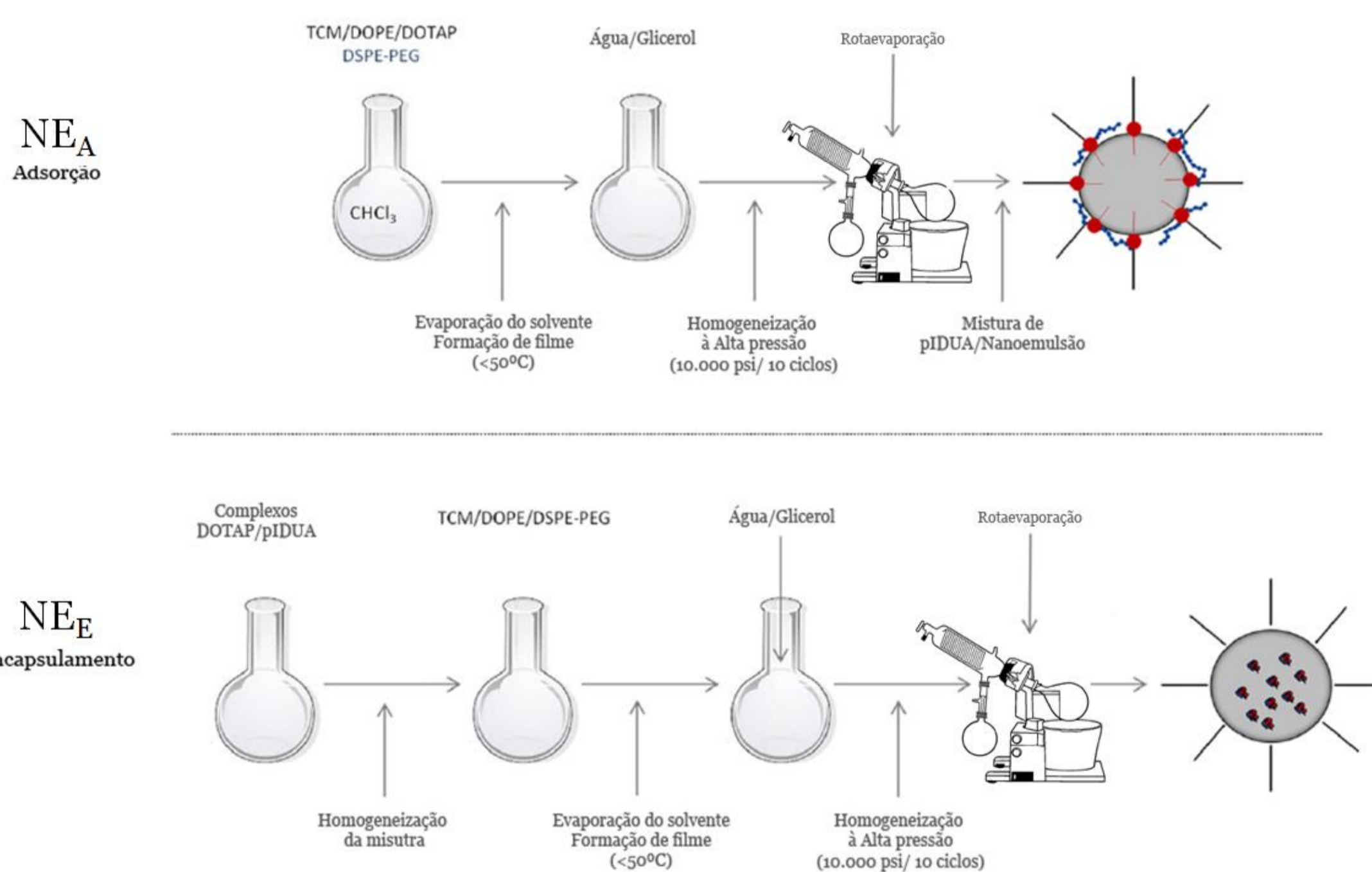


Figura 1. Representação das preparações dos complexos de nanoemulsão/pIDUA por adsorção ou encapsulamento.

Caracterização

Espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética

Tamanho médio de gotícula
Índice de polidispersão (i.p.)
Potencial zeta

Eletroforese em gel de agarose

Ensaio de retenção

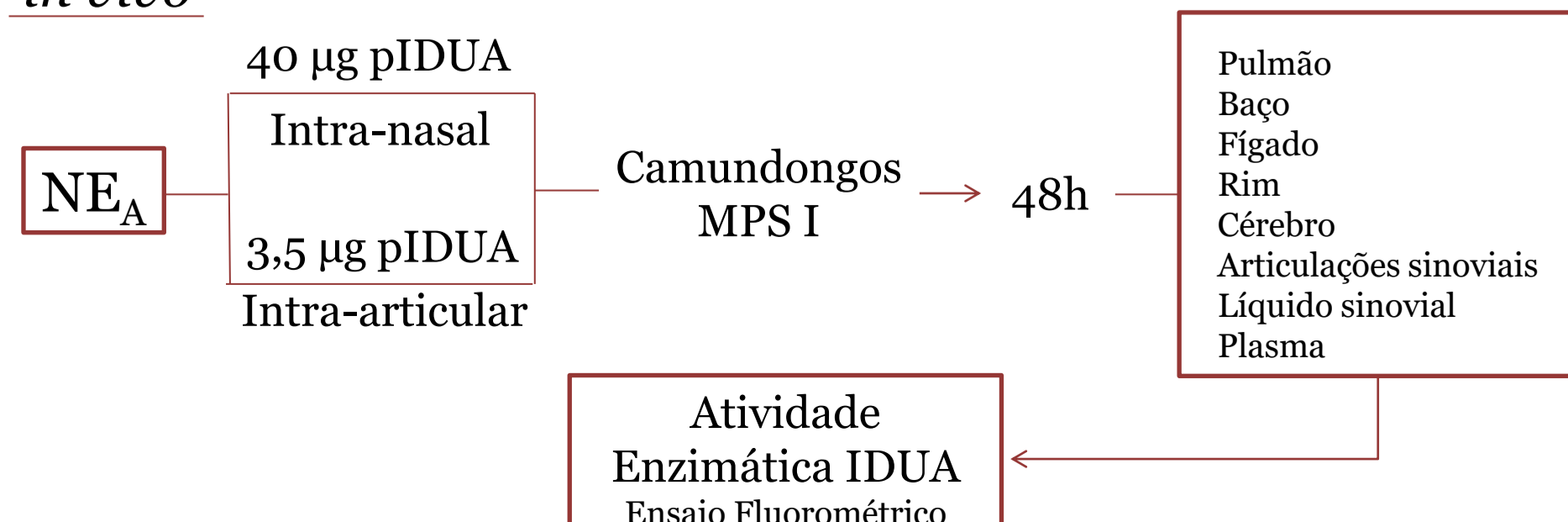
Formação dos complexos

MTT

Ensaio colorimétrico

Citotoxicidade

in vivo

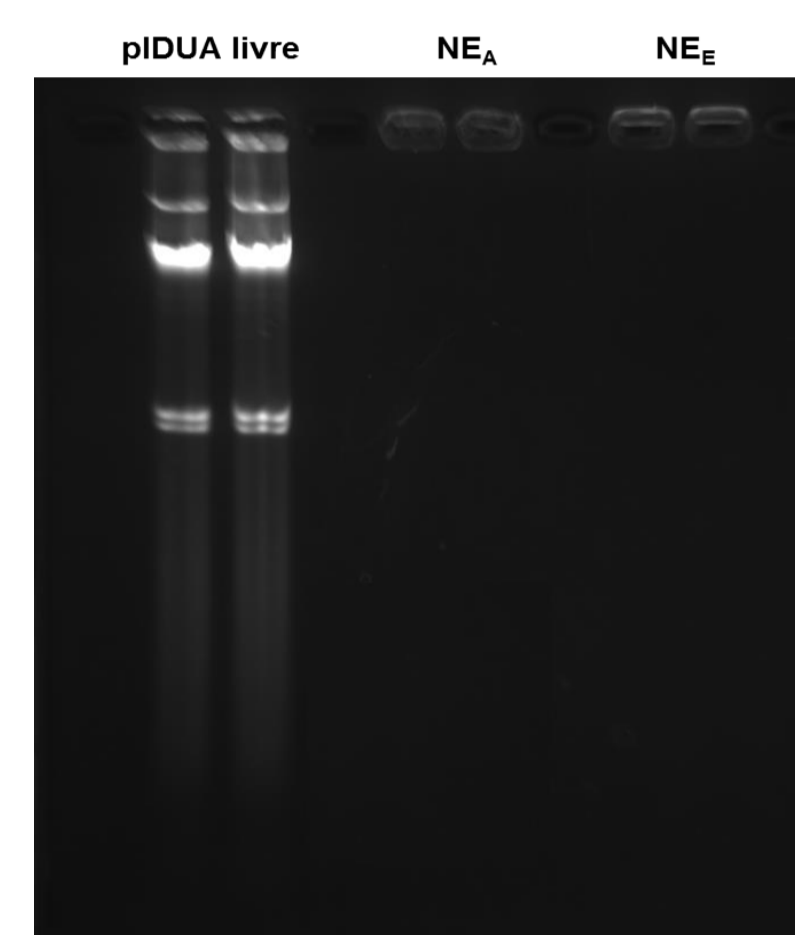


Resultados

As propriedades físico-químicas das nanoemulsões encontram-se na tabela 1. Elas apresentaram-se monodispersas (i.p. <0,25), de tamanho médio na ordem de 200 nm e potencial zeta positivo.

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

Amostra	Tamanho de gotícula (nm)	I.P.	Potencial ζ (mV)
NE	156,79 ± 4,08	0,19 ± 0,03	45,18 ± 1,89
NE _A	199,48 ± 19,41	0,25 ± 0,02	37,78 ± 2,27
NE _E	172,14 ± 10,67	0,20 ± 0,02	44,74 ± 1,52



A complexação do plasmídeo foi demonstrada na relação de cargas utilizada, uma vez que não houve migração dele no gel de agarose, como pode ser visto na figura 2.

Figura 2. Gel de eletroforese do pIDUA livre e dos complexos formados com nanoemulsões catiônicas, por adsorção (NE_A) e por encapsulamento (NE_E).

A avaliação da citotoxicidade demonstrou que ambos complexos, em dose de até 30 µg de plasmídeo, não foram tóxicos frente aos fibroblastos de pacientes MPS I (figura 3).

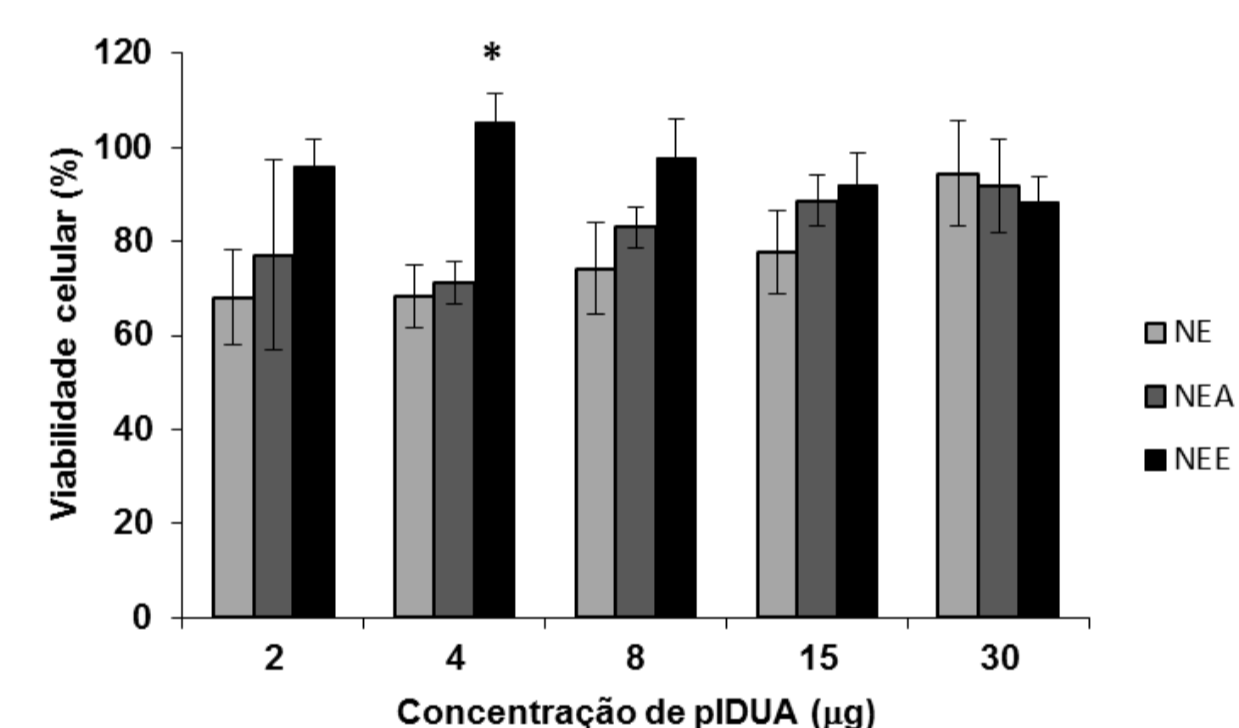


Figura 3: Viabilidade celular (%) após tratamento de fibroblastos de pacientes MPSI com a nanoemulsão branca (NE), complexo obtido por adsorção (NE_A) ou complexo obtido por encapsulamento (NE_E). * diferença significativa, ANOVA (p<0,05).

Tabela 2: Atividade da enzima IDUA em diferentes tecidos após tratamento pelas vias intra-nasal e intra-articular com os complexos NE_A.

	ATIVIDADE IDUA (nmol/h/mg)	
	Intra-articular	Intra-nasal
Fígado	0,14 ± 0,03	0,26 ± 0,07
Rim	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,01
Baço	0,20 ± 0,04	0,24 ± 0,08
Pulmão	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,05
Cérebro*	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Articulação	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,03
Líquido Sinovial*	2,72 ± 0,42	0,91 ± 0,25
Plasma*	0,42 ± 0,01	0,11 ± 0,03

* diferença significativa, ANOVA (p<0,05).

No ensaio *in vivo*, houve aumento da atividade enzimática de IDUA no cérebro dos animais MPS I após administração intra-nasal, e no líquido sinovial após administração intra-articular (tabela 2). No entanto, na cápsula articular não foi observada alteração.

Conclusão

Os resultados demonstram que os complexos obtidos de nanoemulsões catiônicas peguiladas com pIDUA são eficientes na transfecção do gene que codifica para enzima IDUA. A administração pelas vias intra-nasal e intra-articular resulta em diferentes tipos de resposta, sendo relevante no tratamento localizado de regiões altamente afetadas em pacientes MPS I.