

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Avaliação da Transferência Gênica pela Via Nasal para o Sistema
Nervoso Central Utilizando um Vetor Não Viral**

Tiago Pires Dalberto

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

Orientadora: Prof. Dra. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre

Abril de 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Financiamento: CNPq e FAPERGS.

Esta dissertação é dedicada à aqueles que nunca me faltaram e são os responsáveis pela sua concretização, meus avós, Olavo e Zola

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra Nance Nardi, que em todos os momentos esteve perto (mesmo quando estava em outro continente), me dando todo apoio possível.

Aos meus avós, por todo o suporte, exemplos, e concessões que fizeram por mim desde o meu nascimento até agora, sendo sempre o meu porto seguro. Vô, a única coisa que eu realmente lamento é que tu não podes presenciar o final desta jornada, que também foi tua e da vô. Não te preocupa, estou seguindo a risca a última frase que dissestes a mim e a Marina, na nossa última despedida – “tchau e sejam felizes”. Um caráter não pode ser só formado por bons exemplos, por isso agradeço aos meus pais por me ensinarem como não ser.

Obrigado a toda a família imunogenética – Andrés, Luiza, Isabel, Pricila, Lari, Bruno, Daniel G, Daniel O, Andréia W., Paula, Alessandra B., Flávia, Gustavo, Tiago, Tati, Lindolfo, Renata, Anne, Andréia V, Dona Dilma, Zeca, Kátia, Marion - pela ajuda na bancada (e fora dela) e momentos de descontração. Gostaria de agradecer em especial à Mel e ao Pedro, pelo auxílio dos últimos meses!

Às professoras Marilda Fernandes e Elisa Winkelmann e ao bolsista Ricardo Santin, do laboratório de pesquisa em patologia por disponibilizar o seu escasso tempo e vasto conhecimento.

Aos colegas de mestrado e de departamento que estiveram próximos de mim nestes turbulentos 24 meses. É impossível não citar alguns nomes em especial: Jéferson Fregonesi, Vandervei, Nice, Tábita, Carol, Pricila Prestes, Fernanda Spies, Deise, Matias, Francine, Claiton.

Aos grandes amigos do RPG de toda (na verdade nem toda) terça: Rodrigo, Rogério, Fernando, Carlos, Luciano e André. Ou deveria dizer: Mestre, Talgor, Aegon, Andrews, Shion e David?

Aos grandes amigos (humanos e caninos) que fiz no “cachorródromo da redenção”, pelos chimarrões e conversas enquanto os cuscos brincavam. E também pelos poucos churrascos e festinhas fora do parque. Entre todos gostaria de citar aqueles que se tornaram muito próximos: Simone, Carol, Oscar, Cuca, Miguel, Gustavo, Rita.

À família Muschner que esteve sempre por perto na primeira metade desta jornada. À família Macagnan por terem me acolhido tão carinhosamente neste último ano. Em especial a minha “cunhada” Vica que me deu uma baita força cuidando da minha cusca no último mês.

À Panda, a cusca mais sem vergonha que existe, que sempre me recebe com uma imensa festa independente de qualquer coisa, e a Pepa, a mais nova comparsa.

Por último e, sem qualquer sombra de dúvidas, nem um pouco menos importante, agradeço à responsável por eu não ter enlouquecido nestes últimos meses. Obrigado Marina, por toda a compreensão, carinho e apoio nesta reta final, não poderia estar em mais perfeitas mãos!!! EU TE AMO!!!

Lista de Abreviaturas

β -Gal – beta-galactosidase

BBB - *blood-brain barrier* (barreira hematoencefálica)

EGFP – *enhanced green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente otimizada)

GAGs – glicosaminoglicanos

gapdh – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

GFP - *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

hGH – *human growth hormone* (hormônio de crescimento humano)

HIV – *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HRP - *horseradish peroxidase* (peroxidase de raiz forte)

IDUA - α -L-iduronidase

LSD – *lysosomal storage disease* (doença de armazenamento lisossomal)

MPS I - mucopolissacaridose tipo I

NGS - *normal goat serum* (soro de cabra normal)

PBS – phosphate buffered saline

RSV - *Rous sarcoma virus* (vírus do Sarcoma de Rous)

RT – *Room temperature* (temperatura ambiente)

SNC – sistema nervoso central

TG – terapia gênica

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
<i>Terapia gênica</i>	10
<i>Vias de administração do vetor</i>	14
<i>A via nasal</i>	16
Objetivos	21
Targeting the central nervous system by intranasal administration of plasmid DNA	22
Informações complementares	43
<i>Produção do vetor</i>	44
<i>Teste funcional do vetor</i>	45
<i>Experimento piloto 1: biodistribuição do vetor</i>	45
<i>Experimento piloto 2: expressão de EGFP no cérebro</i>	47
<i>Experimento piloto 3: redução da autofluorescência basal</i>	48
<i>Experimento piloto 4: transcrição do EGFP</i>	50
Discussão	51
Referências bibliográficas	54

Resumo

O estudo de metodologias que possibilitem o acesso de moléculas terapêuticas ao cérebro evitando a barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier*, BBB), é extremamente importante para o tratamento das doenças que afetam o sistema nervoso central. Os estudos se concentram na busca por vias seguras e pouco invasivas. Recentemente a via nasal tem mostrado resultados positivos na administração de fármacos ao sistema nervoso central de maneira segura, sugerindo a utilização desta via para a terapia gênica. Neste trabalho, foi estudada a administração intranasal de um vetor não viral, que codifica o gene da proteína verde fluorescente otimizada (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP), diluído em água ou em solução de sulfato de zinco em camundongos adultos da linhagem BALB/c. Os resultados de RT-PCR mostraram que o vetor atingiu o cérebro em ambos tratamentos, e sua expressão foi mantida até 8 semanas após o tratamento. A expressão da EGFP em diferentes regiões cerebrais foi analisada 1, 2, 4 e 8 semanas após o tratamento, através de imunohistoquímica. Nossos resultados mostraram que um número muito pequeno de células foi transfectado em ambos tratamentos e que a frequência destas células nas regiões cerebrais estudadas varia muito mesmo entre animais do mesmo grupo. O tratamento com sulfato de zinco não aumentou a eficiência do vetor. Os maiores números de células transfectadas encontradas foram no bulbo olfatório e hipocampus uma semana após o tratamento. Nossos resultados mostram pela primeira vez a expressão prolongada de um gene administrados pela via nasal no cérebro.

Abstract

The investigation of methods that allow the access of therapeutic molecules to the brain, overcoming the blood-brain barrier (BBB), is of great importance for the treatment of diseases reaching the central nervous system. Studies concentrate mainly on the search for safer and less aggressive routes. Recent studies have suggested that pharmaceutical agents can reach the brain by the nasal route, that may thus be also appropriate for gene therapy. Here, we investigated brain targeting by intranasal administration of a plasmid vector (pREGFP) with the reporter gene EGFP, diluted in water or in a zinc sulfate/water solution, to adult BALB/c mice. Brain regions were examined by RT-PCR or immunohistochemistry 1, 2, 4 or 8 weeks after the treatment. RT-PCR results showed that the plasmid DNA reached the brain similarly with the two types of treatment. Expression of *egfp* was observed in all groups, and maintained even 8 weeks after treatment. Brain sections submitted to immunohistochemistry (IHC) were analyzed for the detection of EGFP-positive cells, that could be observed in brain samples from mice treated by intranasal administration of pREGFP. The frequency of EGFP-positive cells was very low, and presented great variation even among mice from the same experimental group. The supplementation of the transfection medium with zinc sulfate did not induce higher numbers of EGFP-positive cells. A higher frequency of these cells was observed in the olfactory bulb one week after treatment, and in the hippocampus as compared to other brain regions. Our results show for the first time the long-term expression of a gene carried by a nonviral vector to the central nervous system.

Introdução

Terapia gênica

O desenvolvimento massivo das técnicas de biologia molecular vem possibilitando a identificação cada vez mais detalhada das bases genéticas da patogênese de muitas doenças. Estes conhecimentos vêm propiciando a criação de estratégias clínicas baseadas na inserção e expressão de genes com finalidade terapêutica, conhecidas como terapia gênica (TG) (Parker et al., 2003).

De maneira geral, esta abordagem se resume à adição de genes exógenos com o intuito de suprir ou bloquear a função de genes defeituosos. A transferência gênica pode ser realizada em células coletadas do paciente e posteriormente reintroduzidas no mesmo (*ex vivo*), pode ser realizada diretamente no paciente (*in vivo*) (Nardi et al., 2002) ou o vetor pode ser administrado ao líquido amniótico (*in utero*) (Garrett et al., 2003).

Uma questão de extrema importância para a TG é a seleção de um vetor que vai transportar o gene de interesse (neste caso chamado de transgene) até o tipo celular, tecido ou órgão alvo. O vetor deve apresentar uma série de características que tornam seu uso viável e seguro, entre elas: permitir a acomodação de um grande transgene e de todos os elementos fundamentais para a expressão deste, permitir a regulação da quantidade e do tempo de expressão do transgene, fácil manipulação possibilitando a produção em grande escala viável, ausência de efeito colateral como resposta imunológica ou toxicidade, e não indução de mutagênese por inserção em sítio indesejado (Nardi et al., 2002). O vetor que possui todas estas características não existe. Na prática podemos contar com diferentes sistemas de vetores que vêm sendo avaliados por muitos grupos com o intuito de aprimorar a eficiência, a estabilidade e a segurança

da transferência gênica. (revisado por Jakobsson e Lundberg, 2006).

De uma maneira geral os vetores são divididos entre aqueles originados de vírus, chamados de vetores virais, e aqueles onde o transgene está inserido em um plasmídeo, chamados de vetores não virais ou plasmidiais.

Os vetores virais representam um grande grupo de sistemas de transferência gênica bastante heterogêneo, mas todos apresentam maior eficiência que os sistemas de vetores não virais. Estes vetores são classificados e nomeados de acordo com os vírus nos quais foram baseados. A transferência gênica mediada por estes vetores é chamada de transdução. O ponto mais importante para a classificação destes vetores diz respeito à capacidade de integração do transgene à célula transduzida. Aqueles que possuem esta capacidade são chamados de vetores virais integrativos, os demais se mantêm na célula sem promover a integração do transgene ao genoma da célula hospedeira e são chamados de episomais. Os sistemas de vetores integrativos mais conhecidos são aqueles baseados em retrovírus e nos vírus adeno-associados. Os sistemas baseados em adenovírus se mantêm de forma episomal.

Os vetores baseados em retrovírus são subdivididos entre aqueles produzidos a partir de representantes da subfamília oncovirinae, chamados de vetores onco-retrovirais ou retrovirais, e aqueles produzidos a partir de representantes da subfamília lentivirinae, chamados de vetores lentivirais. Todos estes vetores possuem como vantagens: fácil manipulação e produção, grande eficiência na transdução e expressão do transgene por um longo período. A maquinaria enzimática dos lentivírus lhes permite a transdução de células quiescentes, fazendo com que estes vetores não dependam do rompimento da carioteca, ocasionado pela divisão celular, como os retrovírus. As principais desvantagens deste conjunto de vetores consistem na possibilidade de mutagênese insercional, pequena capacidade de acomodação do transgene (cerca de 8 kb) e nas

considerações éticas, especialmente no uso de vetores baseados no lentivírus HIV (revisado por Pagès e Bru, 2004).

Os vetores baseados em vírus adeno-associados pertencem aos parvovírus não patogênicos que naturalmente requerem um vírus auxiliar, geralmente um adenovírus, para poderem transduzir. Estes vetores são considerados muito seguros, já que não são patogênicos. Mas apresentam a menor capacidade de acomodação de transgene entre os sistemas virais, 5 kb e difícil manipulação e, conseqüentemente, produção (Smith, 2003).

Os adenovírus possuem a capacidade de transduzir um grande número de tipos celulares, tornando muito atrativo o uso sistêmico destes vetores. Possuem capacidade de carregar um transgene maior que 8 kb e são produzidos em grande quantidade com facilidade (Gardlík et al., 2005). Estudos mostram que, apesar de não serem vírus integrativos, a expressão do transgene transportado pode permanecer por até um ano (Smith, 2003). A grande desvantagem destes vetores diz respeito à segurança, pois são capazes de induzir forte resposta imunológica (Connelly et al., 1999).

Os vetores não virais possuem menor eficiência que os vetores virais, falta de direcionamento ao tecido alvo, e não se integram ao genoma da célula hospedeira, mantendo-se de forma episomal. Esta última característica traz como conseqüência uma transferência gênica ou, neste caso, transfecção, transiente do transgene. Os métodos de transferência destes sistemas podem ser divididos em duas categorias: físicos e químicos.

Os métodos físicos baseiam-se na entrada do vetor na célula alvo a partir de processos mecânicos ou elétricos (Herweijer e Wolff, 2003). As metodologias variam bastante (revisado por Parker et al., 2003), mas se baseiam geralmente nas seguintes abordagens: injeção direta do DNA na célula alvo (microinjeção); abertura de poros

causada pela pressão criada pela injeção do vetor diluído em grande quantidade de solução salina na corrente sanguínea (injeção hidrodinâmica), bombardeamento do vetor complexado com microesferas de ouro ou tungstênio, aceleradas por um gás carreador nas células alvo (biobalística), ou pela criação de poros na célula alvo após a aplicação de pulsos elétricos alternados, de alta voltagem (eletroporação).

Os métodos químicos empregam materiais sintéticos de carga positiva (catiônicos) que se complexam espontaneamente com o DNA, que possui carga negativa. O objetivo desta abordagem é diminuir a força de repulsão entre o DNA e o domínio extracelular das proteínas de membrana, que também possui carga total negativa. Estes métodos apresentam baixo custo e fácil manipulação e produção. Os materiais sintéticos são divididos em lipídeos catiônicos e polímeros catiônicos e compostos químicos.

Os lipídeos catiônicos formam uma estrutura de dupla membrana chamada de lipossomo ou micela. A entrada do lipossomo na célula se dá por meio de endocitose. Os polímeros catiônicos se ligam ao DNA através de interações iônicas. Devido à grande quantidade de polímeros catiônicos comercializados atualmente, o pesquisador pode selecionar aquele que apresenta a melhor estrutura para transfectar a célula alvo específica, já que diferentes tipos celulares do mesmo tecido não apresentam homogeneidade na eficiência de transferência gênica com o mesmo polímero (Wong et al., 2004). Estes polímeros também protegem o DNA do ataque de nucleases e da degradação pelo lisossomo.

Os compostos químicos têm como base a liberação de cátions, em solução aquosa, que se ligam ao DNA. O fosfato de cálcio é o composto mais utilizado para a produção de vetores virais, e mesmo com uma eficiência relativamente alta, não é indicado para o uso *in vivo*. Um outro composto pouco utilizado é o cloreto de zinco

que, em solução, libera íons Zn^{2+} e contribui significativamente para o aumento da expressão do transgene (Tucker et al., 2004).

Vias de administração do vetor

Juntamente com a seleção do vetor é importante a escolha da via pela qual este será administrado. Para selecionar a via mais adequada devem-se considerar alguns fatores, entre os quais podem ser incluídos o tecido alvo e as barreiras fisiológicas e celulares a serem transpostas.

O alvo da TG pode ser um tecido específico, ou pode-se desejar a administração sistêmica do vetor. No primeiro caso o tratamento de câncer, diabetes mellitus tipo I e da fibrose cística podem ser usados como exemplo; já no segundo caso as doenças de acúmulo lisossomal se mostram um exemplo bem representativo.

Na administração sistêmica, a via intravenosa é uma excelente opção. No estudo realizado por McCormack et al. (2001) foi aplicada injeção intravenosa de um vetor retroviral com o gene do hormônio do crescimento humano (hGH). Foi detectada expressão de hGH no fígado e pulmão. No estudo desenvolvido por Camassola et al. (2005) em nosso laboratório, foi administrado um vetor não viral contendo o cDNA do gene da α -L-iduronidase no modelo murino para mucopolissacaridose tipo I (MPS I), doença causada pela deficiência desta enzima, através de injeção hidrodinâmica do plasmídeo na veia caudal em solução salina ou com injeção intraperitoneal do vetor complexado com o polímero catiônico Superfect. Na análise realizada por RT-PCR em tempo real foi detectada a expressão do transgene em todos os órgãos analisados dos animais tratados tanto pela via intravenosa como pela via intraperitoneal.

Um bom exemplo de administração a um tecido específico é o trabalho de Woodley et al. (2004), que reverteram os sinais clínicos da distrofia epidermolítica

bulosa em células de pacientes enxertadas em camundongos atímicos. Foi utilizado um vetor lentiviral que codificava o gene do colágeno tipo VII, através de injeção intradérmica.

O sistema nervoso central (SNC), especialmente o encéfalo, é o alvo que apresenta maior dificuldade de ser atingido, devido à barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier*, BBB) (Loftus et al., 2006). A BBB é formada pela grande coesão das células endoteliais dos capilares cerebrais limitando a passagem de substâncias do sangue para o cérebro. Este controle rigoroso faz com que apenas substâncias de massa inferior a 600 Da, hidrofóbicas, ou dependentes de transporte ativo possam chegar facilmente até o encéfalo (Graff e Pollack, 2003). A BBB apresenta ainda um aspecto enzimático. Solutos que passam pela membrana celular são imediatamente expostos a enzimas degradativas, já que as células endoteliais possuem grande densidade de lisossomos. Outra característica que torna a BBB tão eficiente é a grande concentração de glicoproteína P, encarregada do transporte de drogas do citoplasma para a membrana do lúmen do capilar do endotélio cerebral (Graff e Pollack, 2003). Devido a este contexto, uma série de estratégias para burlar ou desorganizar temporariamente a BBB foram desenvolvidas para que moléculas terapêuticas, em geral, possam chegar até o encéfalo.

A estratégia mais agressiva utilizada baseia-se no uso da via trans-cranial através de intervenção cirúrgica, que possibilita a entrada da molécula de interesse no encéfalo sem que esta seja exposta a BBB. As abordagens mais utilizadas são injeção intracerebral e infusão intraventricular ou intratecal, onde o fármaco é aplicado diretamente no líquido cerebrospinal (CSF). Ambas abordagens, entretanto, além de serem muito invasivas são limitadas pela lenta difusão do fármaco no encéfalo, fazendo com que este fique restrito ao sítio de aplicação (revisado por Pardridge, 2005).

Uma estratégia amplamente testada em nível pré-clínico é a modificação dos fármacos com o intuito de aumentar a hidrofobicidade facilitando sua passagem pela BBB. Uma maneira utilizada é a administração de formas inativas (pré-drogas) mais lipofílicas que a droga, e que se tornam ativas após modificação *in vivo* (revisado por Misra et al., 2003). Outro método é tornar o fármaco complexado a substâncias que possuem estas características, aumentando assim sua penetração no encéfalo (Xie et al., 2005).

A disrupção temporária da BBB causada por agentes hipotônicos é outra maneira de se introduzir uma molécula terapêutica no encéfalo (Xie et al., 2005). Mas esta é outra estratégia agressiva, pois esta disrupção também possibilita a entrada de moléculas que podem exercer um efeito deletério para o SNC.

Outra estratégia é a exploração de vias menos invasivas para administração do fármaco, que facilitem a entrega de moléculas terapêuticas ao encéfalo e ao mesmo tempo não sejam tão invasivas.

A via nasal

A via nasal é comumente usada para o tratamento de males locais como congestão, irritação ou inflamação nasal, mas ultimamente tem chamado a atenção de diversos grupos de pesquisa como alternativa para a administração sistêmica de drogas. A literatura é rica em exemplos da utilização desta via na administração sistêmica de diversos fármacos como fatores de crescimento, morfina e citocinas (revisado por Illum, 2003).

As principais vantagens desta via perante outras vias sistêmicas incluem a rápida absorção do fármaco pela mucosa nasal; fácil administração, dispensando a esterilidade do material e o treinamento de pessoas para aplicação; pouco ou nenhum efeito

colateral; e relativa eficiência, já que evita contato hepático e gastrointestinal como na via oral. Entre as desvantagens pode ser citada a rápida remoção da droga pelos cílios da mucosa nasal (revisado por Davis e Illum, 2003).

Mas não é só na administração sistêmica que a via nasal tem se mostrado eficaz. Outro fato importante é a que a anatomia da cavidade nasal oferece entrada para o SNC sem a BBB. Isto se deve aos dendritos das células do nervo olfatório, localizados na parte superior da cavidade nasal, fazendo a interface entre meio externo e o SNC (Thorne et al., 2004). Em geral existem três rotas que a droga pode seguir após a administração nasal: passagem direta da mucosa nasal para a circulação sanguínea, entrada no bulbo olfatório via transporte neuronal ou entrada direta no encéfalo (Graff e Pollack, 2003). Embora não encontre a BBB nestes casos, o fármaco precisa passar pela membrana aracnóide que separa o líquido cerebrospinal olfatório do espaço sob o muco do nariz, que também apresenta junções muito coesas (revisado por Davis e Illum, 2003).

Na literatura já se podem encontrar exemplos com diversos tipo de vetores usados via nasal para a transferência gênica. É ainda uma via pouco explorada, e a maioria dos trabalhos estão voltados para a investigação de seu potencial na transferência gênica. A forma mais comum de se realizar este tipo de trabalho é o emprego de genes que codifiquem peptídeos ou enzimas de fácil detecção e que fazem parte de uma estratégia corriqueira quando se deseja estudar transferência gênica (Teixeira et al., 2002). Estes genes são chamados de genes repórteres. Entre os mais utilizados se encontram o gene da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) e suas variantes (Jerusalmi et al., 2003), o gene da enzima β -galactosidase (Oh et al., 2001) e o gene da enzima luciferase (Li et al., 2004).

Um dos primeiros trabalhos a explorar o potencial desta via foi publicado por Oh et al. (2001), e teve como objetivo analisar a absorção e biodistribuição de um vetor não viral utilizando como gene repórter o gene da Beta-galactosidase (β -gal) em camundongos. Os pesquisadores verificaram a expressão deste gene 15 minutos e 24 h após a aplicação, em diversos tecidos e órgãos como músculo, linfonodos, fígado, pulmão, baço, coração, rim e cérebro.

A maior parte dos trabalhos publicados usando esta via se concentram no estudo de possíveis tratamento de males que afetam o pulmão, como se pode verificar no artigo publicado por Pringle et al. (2005). Neste trabalho os autores investigaram a transferência de um gene repórter nas vias aéreas de camundongos, usando o lipossomo GL67. Os resultados indicaram que o gene usado, no caso o gene da luciferase, foi expresso no pulmão, sendo constatada a presença do plasmídeo intacto por até uma semana, mas sem detecção da atividade de luciferase.

Uma outra possibilidade de uso da via nasal é na produção de hormônios e outros peptídeos para administração sistêmica. Tanaka et al. (2004) estudaram o efeito da administração diária, por 12 dias, de um plasmídeo com o gene da insulina ou gene repórter da luciferase complexado com lipossomo em camundongos que tiveram diabetes induzida por estreptozocina. Os resultados foram bastante animadores, mostrando que todos os animais tratados com o gene repórter morreram, enquanto aqueles tratados com o gene da insulina sobreviveram. Nesta mesma publicação, os autores investigaram a biodistribuição do vetor com insulina e constataram a transcrição do vetor somente nos alvéolos pulmonares, indicando que o vetor não foi internalizado por outros tecidos. No trabalho publicado por Griesenback et al. (2001), foi realizada a comparação entre três vias diferentes para a produção sistêmica de peptídeos. Aqui os autores optaram pela utilização de um vetor viral, o vírus Sendai recombinante

carregando o gene da interleucina-10. O vetor foi aplicado via intramuscular, via nasal e via pulmonar. A via pulmonar foi a que apresentou maior eficiência, sendo a via nasal com eficiência intermediária e a via intramuscular a com menor eficiência.

Han et al. (2007) compararam a eficiência da transferência gênica para o encéfalo de camundongos utilizando dois vetores não virais com tamanhos diferentes, pCMVB (7,2 kb) e pN2/CMVB (14,1 kb), codificando o gene da β -gal, administrados pela via nasal e pela via intravenosa. O primeiro resultado deste estudo mostrou que ambos os vetores atingiram o encéfalo pela via nasal, mas o pCMVB mostrou-se mais eficaz, indicando que o tamanho do vetor influencia na sua eficiência por esta via. No mesmo estudo, foi avaliada a distribuição de pCMVB no encéfalo em três tempos diferentes (5, 10 e 60 minutos) após administração intranasal e intravenosa. O vetor atingiu diversas regiões do encéfalo nos dois tratamentos. A via intravenosa pareceu ser a de maior eficiência a curto prazo, já que resultou em maior quantidade do vetor em 5 minutos em todas as regiões estudadas (bulbo olfatório, área do septo, estriado, hipotálamo, tálamo, mesencéfalo, hipocampo, medula oblonga e cerebelo). Entretanto, 60 minutos após o tratamento foi observada maior quantidade do vetor nos camundongos tratados pela via nasal.

Os resultados de Han et al. (2007) e Oh et al. (2001) mostram que a administração de um plasmídeo pela via nasal pode ser importante na terapia de males que afetem o SNC, onde o gene de interesse não requer a transferência gênica a um ou mais tipos celulares específicos. As doenças de acúmulo lisossomal (*lysosomal storage disease*, LSD), como a MPS I, se enquadram perfeitamente entre as candidatas a este tipo de tratamento. A MPS I é causada pela deficiência ou ausência da enzima α -L-iduronidase (IDUA), e caracteriza-se pelo acúmulo dos glicosaminoglicanos (GAGs) dermatan sulfato e heparan sulfato. As características clínicas são bastante variadas,

sendo que na forma mais grave há comprometimento do sistema nervoso central, gerando retardo mental. A terapia gênica se mostra uma alternativa promissora, já que se trata de uma doença monogênica (Camassola et al., 2005).

O presente estudo mostra a administração de um vetor não viral pela via nasal, diluído em água ou em uma solução de sulfato de zinco em camundongos da linhagem BALB/c, e o acompanhamento da expressão do transgene por oito semanas.

Objetivos

Tendo em vista que um dos principais objetivos de nosso grupo de pesquisa é o estabelecimento de protocolos de terapia gênica no modelo murino de MPS I, é de grande interesse o estabelecimento de métodos de transferência gênica para o sistema nervoso central. O presente projeto teve como objetivo geral o estudo da via nasal como alternativa para a transferência gênica no sistema nervoso central, utilizando para isso um plasmídeo contendo o gene repórter da proteína verde fluorescente otimizada (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP).

Os objetivos específicos deste trabalho podem ser assim definidos:

- Avaliar o potencial da via de administração intranasal na transferência do gene repórter EGFP, em um vetor plasmidial, até diferentes regiões do cérebro de camundongos BALB/c.
- Comparar a eficiência de preparados do vetor plasmidial diluído em água ou em uma solução de sulfato de zinco em água.
- Avaliar a manutenção prolongada da expressão de EGFP nos camundongos BALB/c transfectados.

**Targeting the central nervous system by intranasal administration of
plasmid DNA**

Targeting the central nervous system by intranasal administration of plasmid DNA

Tiago Pires Dalberto¹, Pedro Cesar Chagastelles¹, Melissa Camassola¹, Marilda da Cruz Fernandes², Elisa Cristiana Winkelmann², Ricardo Santin², Nance Beyer Nardi^{1*}

¹ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

² Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author.

Nance Beyer Nardi

Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Av Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: nardi@ufrgs.br

Abbreviated title: Intranasal gene transfer to the brain.

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) represents a major obstacle to effective therapy for neurodegenerative disorders or any disease affecting the brain. Current methods to overcome the problem are very aggressive, and recent studies have suggested that pharmaceutical agents can reach the brain by the nasal route. Here, we investigated brain targeting by intranasal administration of plasmid DNA diluted in water or in zinc sulfate. A plasmid vector (pREGFP) with the reporter gene EGFP was diluted in water or in a zinc sulfate/water solution and nasally administered to adult mice. Brain regions were examined by RT-PCR or immunohistochemistry 1, 2, 4 or 8 weeks after the treatment. RT-PCR results showed that the plasmid DNA reached the brain similarly with the two types of treatment. Expression of *egfp* was observed in all groups, and maintained even 8 weeks after treatment. Brain sections submitted to immunohistochemistry (IHC) were analyzed for the detection of EGFP-positive cells, that could be observed in brain samples from mice treated by intranasal administration of pREGFP. The frequency of EGFP-positive cells was very low, and presented great variation even among mice from the same experimental group. A higher frequency of these cells was observed in the olfactory bulb one week after treatment, and in the hippocampus as compared to other brain regions. The supplementation of the transfection medium with zinc sulfate did not induce higher numbers of EGFP-positive cells. Our results show for the first time the long-term expression of a gene carried by a nonviral vector to the central nervous system.

Keywords: Plasmid DNA, EGFP, intranasal administration, central nervous system.

Introduction

There is a great need for the development of non-viral, non-invasive gene therapy of the brain. The blood-brain barrier (BBB) represents a major obstacle to effective therapy for neurodegenerative disorders, since it limits passage of therapeutics. The obstacle also applies to the treatment of any disorder affecting the brain, as some metabolic diseases such as the mucopolysaccharidoses (Matte et al., 2003). New strategies must be investigated to target large or charged drug molecules, as well as therapeutic genes, across the BBB. Currently, most methods involve the direct administration of the therapeutic agent to the target site (Hereñú et al., 2007), or in the cerebrospinal fluid by lumbar puncture (Shimamura et al., 2005). These methods, however, are very aggressive, and other methodologies are under study. Noninvasive, nonviral gene targeting to the brain has been shown with the encapsulation of the therapeutic gene in pegylated immunoliposomes, tethering targeting monoclonal antibodies to the complex and injection into the bloodstream (Shi and Pardridge, 2000).

The nasal airway has been attracting much attention for the local or systemic delivery of drugs and genes. Gene therapy by intranasal delivery has been suggested for different types of human diseases, such as cystic fibrosis (Noone et al., 2000), diabetes (Tanaka et al., 2004) and intestinal allergic diarrhea (Hino et al., 2005), and the transfected nasal epithelium has been proposed as a factory for systemic protein delivery (Griesenbach et al., 2001). Intranasally administered drugs have also been shown to reach the blood, so that systemic administration of drugs or genes by this route is also possible (reviewed by Illum, 2003).

Recent studies have suggested that pharmaceutical agents can reach the brain by the nasal route. This route is very attractive due to the absence of a blood–brain barrier at

the interface between the nasal epithelium and the brain, and although the mechanisms are not fully understood it is possible that the agent reaches the brain via the bloodstream (Oh et al., 2001) or the olfactory bulb (Thorne et al., 2004). Intranasal delivery of different types of molecules to the brain have been reported, such as proteins (Gao et al., 2006; Loftus et al., 2006), neuropeptides (Born et al., 2002), and insulin (Mitra et al., 2000). Han et al. (2007) investigated the brain targeting efficiency and transport pathways of intranasally administered plasmid DNA, showing that the reporter gene was systemically absorbed and reached the brain, possibly via the olfactory bulb. There is still a need for exploring more efficient methods of nonviral gene targeting to the brain, particularly exploring the maintenance of the transgene expression. One of the points to be explored involves the use of chemical compounds, such as zinc sulfate (Tucker et al., 2004), to enhance the efficiency of gene transfer. Here, we investigated brain targeting by intranasal administration of plasmid DNA diluted in water or in zinc sulfate, showing that the transfected gene is expressed in the brain up to two month after treatment.

Materials and methods

Animals

Adult (8-16 weeks old) BALB/c and EGFP mice (green mouse FM131, kindly provided by M. Okabe, Osaka University, Japan) were used in this study. The animals were kept under standard conditions (12 hours light/12 hours dark, water and food ad libitum) in our animal house. All the experimental procedures were performed according to institutional guidelines.

The EGFP mice were used for the preparation of EGFP-positive samples for control of RT-PCR and immunohistochemistry reactions.

Preparation and intranasal administration of pREGFP

The EGFP reporter gene was subcloned in the mammalian expression vector pREP9 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA), downstream to the Rous sarcoma virus (RSV) constitutive promoter, as previously described (Teixeira et al., 2001). The resulting plasmid (pREGFP) has 11.2 kb. *Escherichia coli* DH5 α -T1^R (Invitrogen) was transformed with pREGFP using standard procedures (Sambrook et al 1989) and the plasmid was purified with PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen). Electrophoresis in 1% agarose gel confirmed the purity of DNA preparations.

For administration of the plasmid DNA, the animals were anesthetized with a combination of ketamine and xilazine (1.16 g and 2.3 g per kg body weight, respectively) delivered intraperitoneally. pREGFP was diluted in water or in a solution

of 3.6 mM ZnSO₄ in water, at 1.25 µg/µl, and 20 µl of the solution was introduced into the left nostril with a pipette tip.

Preparation of samples

Within 1, 2, 4 or 8 weeks after treatment, the animals were anesthetized as described above. The abdominal cavity was opened, the diaphragm was ruptured, and 200 µl of a 0.8% sodium citrate solution were injected into the beating heart. The ascending aorta was catheterized with a 27G intravenous catheter inserted through the left ventricle. The right atrium was cut, and around 100 ml of saline solution 0.9 % were pumped in. After the perfusion, the brain was extracted from the skull and the frontal lobe (except for the olfactory bulb) was harvested for RNA extraction. The remaining of the brain was collected, placed into 4% paraformaldehyde for 12 hours and, subsequently, cryoprotected with 15% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) until the sample was saturated. The samples were then immersed in 30% sucrose/PBS, placed in isopentano and frozen in liquid nitrogen. The brain samples were cut with a cryostat in 4 µm-thick coronal serial sections including the hypothalamus, thalamus, hippocampus and olfactory bulb, using the Paxinos-Watson atlas for anatomical references. The samples were collected on glued slides with an interval of 24 µm.

Immunohistochemistry

Sections were air dried, post fixed in methanol for 10 minutes at room temperature, incubated with H₂O₂ for 30 min and blocked in 1:6 diluted normal goat serum (NGS) for 20 minutes. The sections were then incubated with rabbit policlonal anti-gfp antibody

(Molecular Probes, Eugene, OR) in 1% NGS, for 16 h at 4 °C, followed by incubation with goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA) in 1% bovine serum albumin/PBS. The peroxidase activity was developed by adding diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co. St Louis, MO) for 10 min, and the sections were counterstained with hematoxylin. The slides were rinsed 3 times in PBS between each incubation, except after blocking with NGS. Digital images were recorded using a Zeiss Axiostar Plus microscope and Zeiss Axiovision Software (Zeiss Jena, Germany).

RT-PCR assay of EGFP mRNA expression in the brain

Total RNA was harvested from the frontal lobe with Trizol reagent (Invitrogen, SP, Brazil) according to the manufacturer's instruction. The integrity of total RNA was confirmed by denaturing gel electrophoresis, and the RNA was finally eluted in RNase-free water. Reverse transcription (RT) was performed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) in appropriate conditions. In all reactions, cDNA was synthesized in 20 µl from 2 µg of total RNA. For each reaction, 1 µl oligo(dT)²⁰ (500 mM), and 1 µl dNTP (10 mM) were used. Reactions were incubated at 70°C for 10 min, then 4 µl RT buffer (10×), 2 µl DTT (0.1 mol/L) and 200U RT enzymes were added and the reaction was incubated at 42°C for 90 min. The resulting cDNA was submitted to a PCR reaction with the primers for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene and the *egfp* gene, resulting in amplified fragments of 452 pb and 183 pb in length, respectively. The antisense *egfp* primer was 5'CTTCAAGATCCGCCACAACAT3' and the sense primer was 5'TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC3' (Yao et al., 2004). The antisense *gapdh* primer was 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3' and the sense primer was

5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3' (Rubra et al., 2004). PCR was carried out in a 25 μ l reaction mixture containing 1 μ l of cDNA, 0.1 mM of each primer, 1 mM of each dNTP, 1x Taq DNA polymerase buffer and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR was performed under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by cycles of denaturation at 94°C for 35 sec, annealing at 58°C for 45 sec, and extension at 72°C for 1 min; and a final extension step for 7 minutes. The samples were subjected to 40 cycles, and the PCR products were analyzed on 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide.

Results

Expression of intranasally administered pREGF in the brain was followed during a period of two months. The experimental groups, composed by 5 BALB/c mice, were analyzed in 1, 2, 4 or 8 weeks after treatment by RT-PCR and immunohistochemistry of the brain.

Expression of intranasally administered plasmid DNA in the brain

RT-PCR results showed that the plasmid DNA reached the brain similarly with the two types of treatment. Expression of *egfp* was observed in all groups, and maintained even 8 weeks after treatment, as presented in Fig. 1. The amplification pattern was confirmed by analysis of brain samples from transgenic EGFP mice, and was absent in samples from normal BALB/c animals. Amplification of the *gapdh* gene was observed in all samples studied.

Immunohistochemical analysis of brain regions

Brain sections submitted to immunohistochemistry (IHC) were analyzed for the detection of EGFP-positive cells. IHC of samples from EGFP-transgenic mice resulted in a strong reaction of the whole section with anti-EGFP antibody, and showed that the neuropil was also immunoreactive (Fig. 2a). Control reactions, which included IHC of brain sections from non-treated BALB/c mice or normal C57Bl/6 animals submitted to primary and secondary antibodies, as well as sections from EGFP mice or treated animals without incubation with the primary antibody, showed consistently negative

results (Fig. 2b). EGFP-positive cells, on the other hand, could be observed in brain samples from mice treated by intranasal administration of pREGFP. Cells considered positive (a) presented the immunoperoxidase staining restricted to the cytoplasm, on the same plane of the cell, (b) presented a clear relationship of the cytoplasm with the nucleus, and (c) were located in regions of tissue integrity (Fig. 2c-2e). Olfactory bulb sections were separately analyzed, and showed similar reaction patterns. Only sections with uninjured tissue were analyzed, at least six sections from each animal.

The frequency of EGFP-positive cells was very low (Table 1), and presented great variation even among mice from the same experimental group (Table 2). The results, however, show clearly the presence of positive cells in treated animals even 8 weeks after treatment, and no positive cells in the negative controls, and should therefore be considered in the evaluation of the efficiency of the transfer protocol.

A clear difference is observed when the frequency of EGFP-positive cells in the olfactory bulb is analyzed in animals treated 1, 2, 4 or 8 weeks earlier. Nasal administration of the pREGFP plasmid diluted in water or in zinc sulfate showed clearly higher frequency of positive cells one week after treatment, with a drop in these frequencies on later analyses. Immunohistochemistry of the thalamus, hypothalamus and cortex showed very low numbers of positive cells. The hippocampus, however, showed higher frequency of EGFP-positive cells when analyzed one week (for plasmids diluted in zinc sulfate only) and four weeks (for plasmids diluted in both water or zinc sulfate).

Table 2 presents the individual analysis of these groups. It is interesting to notice that, while the higher frequency of positive cells in the olfactory bulb is due to a more evenly distributed number of positive cells in the five animals composing the groups, for the hippocampus the intragroup variability is much larger.

Discussion

The central nervous system is one of the most difficult targets of gene therapy due to the existence of the blood-brain barrier. In this study, we explored one of the new alternatives currently investigated to overcome this obstacle, the nasal airway. Our results show for the first time the long-term expression of a gene carried by a nonviral vector to the central nervous system. RT-PCR showed that the gene is expressed in the brain up to eight weeks after nasal administration of pREGFP diluted in water or in a zinc sulfate solution. Previous studies have also shown that intranasally administered plasmid DNA presents enhanced brain targeting efficiency (Oh et al., 2001; Han et al., 2007). Gene expression, however, was analyzed in very short periods of time after the treatment (24 h and 14 h, respectively).

The frequency of EGFP-positive cells detected by immunohistochemistry is low, and a great individual variability was observed, which could reflect the existence of experimental parameters not well defined that interfere with the results. The very low number of EGFP-positive cells is also probably responsible for this variability. In all cases, however, EGFP expression was observed in two or more of the brain regions analyzed.

The supplementation of the transfection medium with zinc sulfate did not induce higher numbers of EGFP-positive cells. Zinc has been shown to improve the efficiency of nonviral transfection, but mostly in *in vitro* studies (Niedzinski et al., 2003; Elmadbouh et al., 2004). Further studies are necessary to determine whether the enhancing activity of zinc sulfate is expressed only in the *in vitro* situation, or if in our system this lack of activity was due to the specific route used for plasmid administration.

Different mechanisms could be responsible for the delivery of DNA to the brain after nasal administration. The present study did not allow the identification of the mechanism involved, but the fact that a greater frequency of EGFP-positive cells was observed in the olfactory bulb one week after treatment could suggest that this is the route of delivery of the plasmid DNA to the brain. Other studies have suggested this mechanism (Han et al., 2007), but it is difficult to determine if in that case the plasmid is subject to retrograde axonal transport mechanisms (reviewed by Hanz and Fainzilber, 2004) or to paracellular routes. Since the nasal route may also result in the systemic delivery of therapeutic drugs (reviewed by Davis and Illum, 2003), it is also possible, although less probable, that pREGFP reached the brain after entering the bloodstream.

This study did not allow the identification of the type of cell transfected, so that its potential for treating neurodegenerative diseases may not be appreciated. However, for metabolic diseases affecting the central nervous system, such as mucopolysaccharidosis type I, reposition of a small part of the normal enzymatic activity may result in significant clinical improvement (Matte et al., 2003). Plasmid vectors, that are generally less efficient but safer than viral vectors, are therefore more suitable for gene therapy of this type of disease (Camassola et al., 2005).

Although our results show long-term expression of EGFP, more studies are necessary to further determine the maintenance of this effect, and possibly optimize the use of the nasal route for targeting the brain by adjusting technical variables of the method.

References

- Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U and Fehm HL (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5:514-516
- Camassola M, Braga L M, Cañedo AD, Dalberto TP, Matte U, Burin M, Giugliani R and Nardi NB (2005) Nonviral *in vivo* gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. *J Inher Metab Dis* 28:1035-1043
- Davis SS and Illum L (2003) Absorption enhancers for nasal drug delivery. *Clin Pharmacokinet* 42:1107-1128
- Elmadbouh I, Rossignol P, Meilhac O, Vranckx R, Pichon C, Pouzet B, Midoux P and Michel JB (2004) Optimization of *in vitro* vascular cell transfection with non-viral vectors for *in vivo* applications. *J Gene Med* 6:1112-1124
- Gao X, Tao W, Lu W, Zhang Q, Zhang Y, Jiang X and Fu Shoukuan (2006) Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after nasal administration. *Biomaterials* 27:3482-3490
- Griesenback U, Cassady RL, Ferrari S, Fukumura M, Müller C, Schmitt E, Zhu J, Jeffery PK, Nagai Y, Geddes DM, Hasegawa M and Alton EFW (2001) The nasal epithelium as a factory for systemic protein delivery. *Mol Ther* 5:98-103
- Han, I K, Kim MY, Byun H M, Hwang TS, Kim JM, Hwang KW, Park TG, Jung WW, Chun T, Jeong GJ and Oh YK (2007) Enhanced brain targeting efficiency of intranasally administered plasmid DNA: an alternative route for brain gene therapy. *J Mol Med* 85:75-83
- Hanz S and Fainzilber M (2004) Integration of retrograde axonal and nuclear transport mechanisms in neurons: implications for therapeutics. *Neuroscientist* 10:404-408

- Herenu CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becu-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL and Goya RG (2007) Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther* 14:237-245
- Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K and Kiyono H (2005) Nasal IL-12p70 DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J Immunol* 174:7423-7432
- Illum L (2003) Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 87:187-198
- Loftus LT, Li HF, Gray AJ, Hirata-Funkae C, Stoica BA, Futami J, Yamada H, Aisen PS and Matsuoka Y (2006) In vivo protein transduction to the CNS. *Neuroscience* 139: 1061-1067
- Matte U, Yogalingam G, Brooks D, Leistner S, Schwartz I, Lima L, Norato DY, Brum JM, Beesley C, Winchester B, Giugliani R and Hopwood JJ (2003) Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab* 78:37-43
- Mitra R, Pezron I, Chu WA and Mitra AK (2000) Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin. *Int J Pharm* 205:127-134
- Niedzinski EJ, Olson DC, Chen YJ, Udove JA, Nantz MH, Tseng HC, Bolaffi JL and Bennett MJ (2003) Zinc enhancement of nonviral salivary gland transfection. *Mol Ther* 7:396-400
- Noone PG, Hohneker KW, Zhou Z, Johnson LG, Foy C, Gipson C, Jones K, Noah TL, Leigh MW, Schwartzbach C, Efthimiou J, Pearlman R, Boucher RC and Knowles MR (2000) Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene

transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol Ther* 1:105-114

Oh Y, Kim J, Hwang TS, Ko JJ, Kim JM, Yang J and Kim C (2001) Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine* 19:4519-4525

Rubera I, Poujeol C, Bertin G, Hasseine L, Counillon L, Poujeol P, Tauc M (2004) Specific Cre/Lox recombination in the mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 15:2050-6

Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, EUA. 2nd ed.

Shi N and Pardridge WM (2000) Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7567-7572

Shimamura M, Sato N, Taniyama Y, Kurinami H, Tanaka H, Takami T, Ogihara T, Tohyama M, Kaneda Y and Morishita R (2005) Gene transfer into adult rat spinal cord using naked plasmid DNA and ultrasound microbubbles. *J Gene Med* 7:68-74

Tanaka SI, Yamakawa T, Kimura M, Aoki I, Kamei I and Okuda K, Mobbs C (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res Clin Pract* 63:1-9

Teixeira LAK, Fricke CE, Bonorino CB, Bogo MR and Nardi NB (2001) An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol* 88:159-165

Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V and Frey WH (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127:481-496

Tucker SN, Lin K, Stevens S, Scollay R, Bennett MJ and Olson DC (2004) Salivary gland genetic vaccination: a scalable technology for promoting distal mucosal immunity and heightened systemic immune responses. *Vaccine* 22:2500-2504

Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj RR, Pasceri P, Ellis J (2004) Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther.* 10:27-36.

Table 1 - Number of EGFP-positive cells / total sections examined, in separate brain regions, 1, 2, 4 or 8 weeks after nasal administration of pREGFP dissolved in water (H₂O) or in a solution of zinc sulfate in water (ZnSO₄).

Weeks	Solution	Brain region				
		Olfactory bulb	Thalamus	Hypothalamus	Hippocampus	Cortex
1	H ₂ O	13/67*	0/40	0/40	7/40	0/40
1	ZnSO ₄	15/51*	1/39	0/39	32/39*	0/39
2	H ₂ O	3/34	5/43	1/43	5/43	0/43
2	ZnSO ₄	4/42	7/42	2/42	4/42	1/42
4	H ₂ O	2/31	1/41	0/41	20/41*	1/41
4	ZnSO ₄	1/32	4/35	4/35	35/35*	0/35
8	H ₂ O	3/41	4/48	0/48	4/48	4/48
8	ZnSO ₄	0/30	0/38	3/38	2/38	6/38

* Groups shown in detail in Table 2.

Table 2 - Individual analysis of the number of EGFP-positive cells / total sections from the olfactory bulb or hippocampus examined, 1 or 4 weeks after nasal administration of pREGFP dissolved in water (H₂O) or in a solution of zinc sulfate in water (ZnSO₄).

Weeks	Solution	Brain region	Mouse #				
			1	2	3	4	5
1	H ₂ O	Olfactory bulb	0/6	5/17	0/6	2/13	6/21
1	ZnSO ₄	Olfactory bulb	0/6	2/10	1/13	3/16	9/16
1	ZnSO ₄	Hippocampus	0/8	2/9	23/8	9/7	0/7
4	H ₂ O	Hippocampus	11/10	3/8	2/7	2/8	2/8
4	ZnSO ₄	Hippocampus	16/7	6/8	2/6	5/8	6/6

Figure legends

Fig. 1 – Electrophoresis patterns of the amplification products of brain RT-PCR. 1-4, RT-PCR with EGFP-specific primers. 1, EGFP-transgenic mice; 2, BALB/c treated with pREGFP in water, 8 weeks; 3, BALB/c treated with pREGFP in ZnSO₄, 8 weeks; 4, non-treated BALB/c; 5-9, RT-PCR with gapdh-specific primers. 5, EGFP-transgenic mice; 6, BALB/c treated with pREGFP in water, 8 weeks; 7, BALB/c treated with pREGFP in ZnSO₄, 8 weeks; 8, non-treated BALB/c; 9, PCR negative control.

Fig. 2 – (A) Brains section from EGFP-transgenic mouse, with anti-gfp antibody; (B) brain section of EGFP-transgenic mouse, without anti-gfp antibody and with the secondary antibody; (C,D) brain section of BALB/c mice, treated with pREGFP in water (C) or zinc sulfate/water (D), with primary and secondary antibodies. Bar = 20 μm.

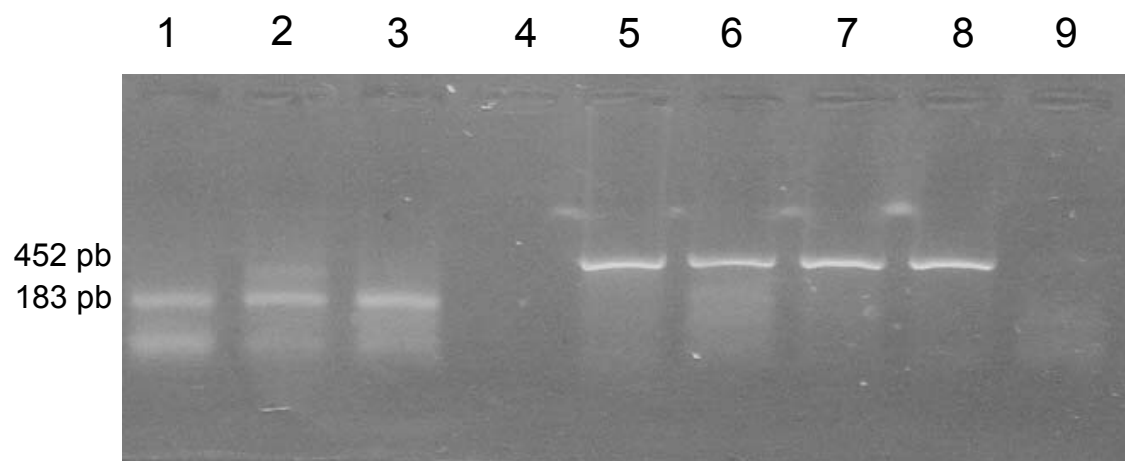


Fig. 1

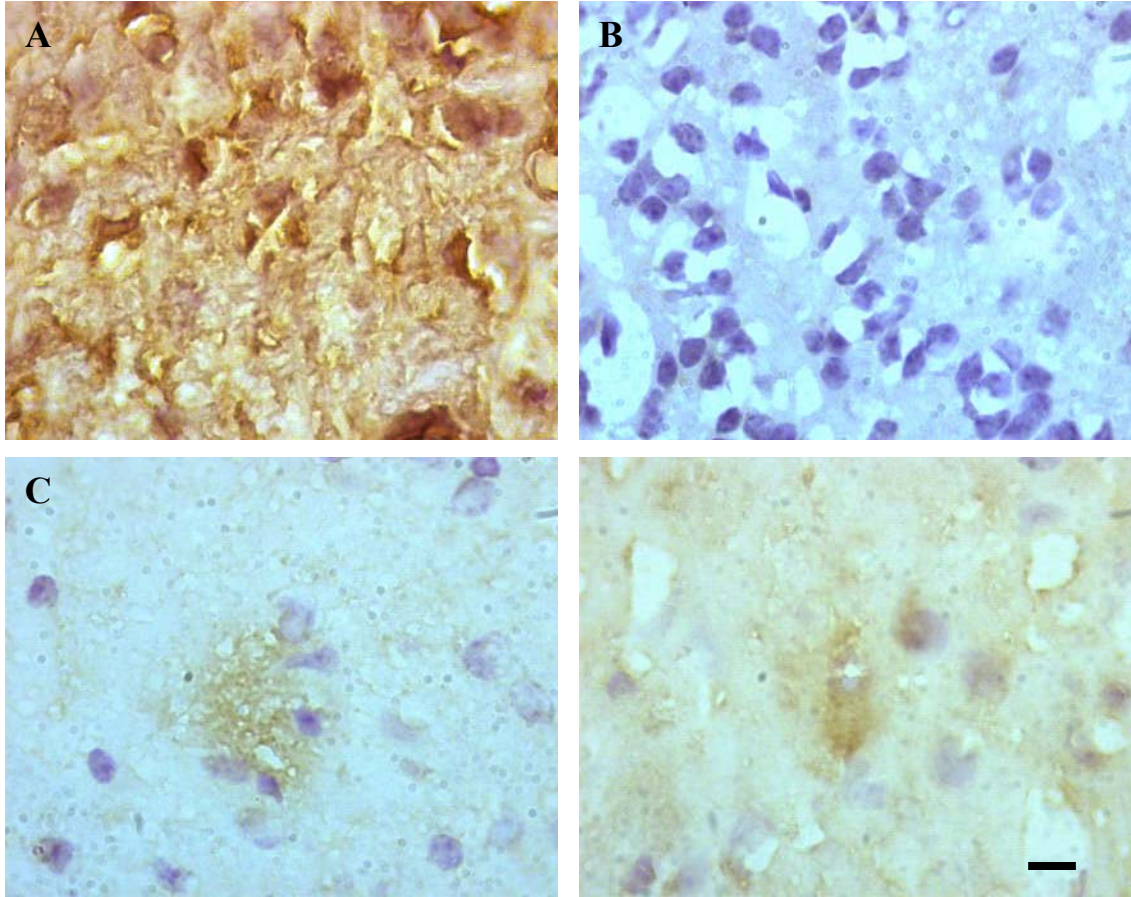


Fig. 2

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos dos experimentos realizados previamente que indicaram quais as regiões do encéfalo foram alcançadas pelo vetor, teste de visualização direta da expressão da EGFP e teste de redução da autofluorescência basal do encéfalo. Estas informações contribuem para o entendimento dos métodos empregados no artigo científico assim como na discussão do trabalho como um todo.

Produção do vetor

O primeiro resultado obtido neste trabalho foi a produção do vetor. Colônias de bactérias *Escherichia coli* foram transformado com pREGFP (figura 1), como descrito por Sambrook et al., 1989. Posteriormente, as colônias foram selecionadas em meio contendo antibiótico e testadas através de reação de PCR quanto à presença de EGFP. As colônias positivas foram crescidas em condições ideais e foram submetidas a extração de DNA plasmidial. O DNA extraído foi clivado por enzimas para confirmar o padrão de clivagem do pREGFP. Após a confirmação deste padrão o vetor foi produzido em larga escala.

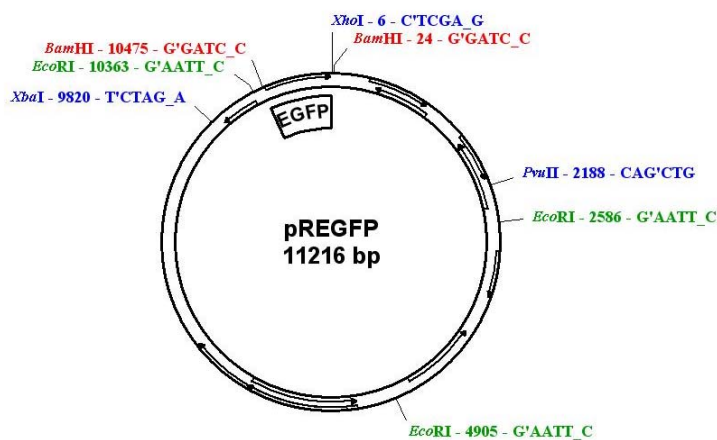


Figura 1 – Representação do vetor EGFP.

Teste funcional do vetor

Após a verificação do padrão de clivagem, o vetor foi submetido a um teste funcional com o objetivo de averiguar a expressão de EGFP após os processos de produção. Este ensaio se baseia na transfecção de células da linhagem Hek 293T pelo vetor. De modo resumido, 10^5 células Hek 293T foram semeadas em cada poço de placas de cultivo celular com 24 poços. Estas células foram cultivadas por 16 horas em condições ideais e posteriormente foram transfectadas por 600 ng de pREGFP complexado a 5 μ L do polímero catiônico Superfect Reagent (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Após 48 horas a expressão do vetor pode ser visualizada por microscopia de fluorescência (figura 2).

Experimento piloto 1: biodistribuição do vetor

No primeiro experimento realizado, 2 animais foram tratados, pela via nasal, com 50 μ g de pREGFP diluídos em 20 μ l água estéril, 3 com 25 μ g de pREGFP diluídos em 20 μ l água estéril e 2 com 20 μ l de PBS; todas as soluções foram administradas na narina esquerda. A diferença entre o número de animais tratados com pREGFP foi ocasionada pela dificuldade de administrar a solução do vetor com concentração de 2,5 μ g/ μ l. Em princípio, conseguimos tratar os 3 primeiros animais com 20 μ l desta solução, mas como a solução entrava muito lentamente na narina do animal e eventualmente era expelida, pensamos que a solução poderia estar muito viscosa. Para testar esta hipótese, a solução foi diluída para 1,25 μ g/ μ l. Nesta concentração, 20 μ l de solução foram administrados sem serem expelidos.

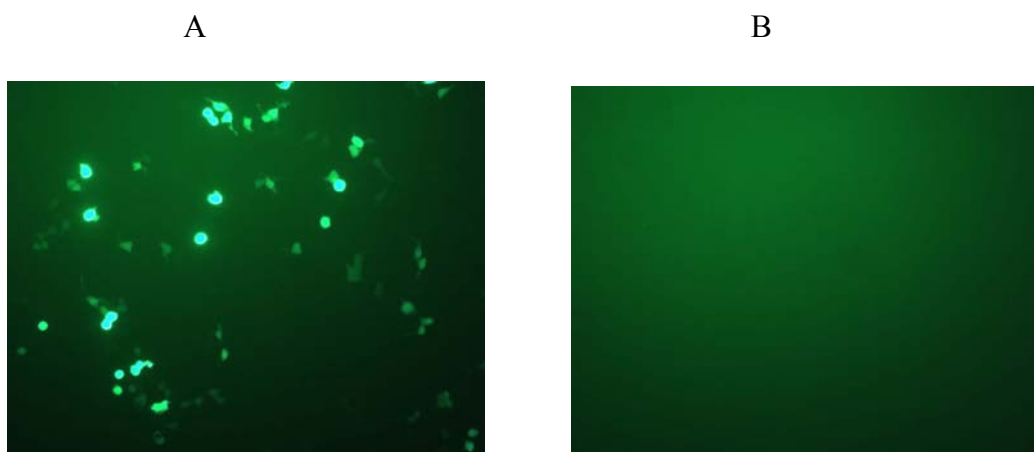


Figura 2 - Resultado do teste funcional do pREGFP em células da linhagem HEK 293T. Análise em microscopia de fluorescência, aumento de 100x . A) células transfectadas com 600 μg de pREGFP complexadas com 5 μl de Superfect Reagent; B) controle negativo da transfecção.

Uma semana após o tratamento, um animal de cada grupo foi sacrificado e foram coletados o encéfalo, o rim, o fígado, o baço, o coração, o pulmão e a medula espinhal. O encéfalo foi dividido nos dois hemisférios e foram separados de cada hemisfério o córtex, o cerebelo, o hipotálamo, o estriado e o bulbo olfatório. Todas estas amostras foram submetidas a extração de DNA, mas devida a problemas técnicos não conseguimos obter DNA.

O mesmo procedimento foi repetido, com sucesso, quatro semanas após o tratamento, com os animais restantes. Todas amostras foram submetidas a PCR com os oligonucleotídeos específicos para *gapdh* e EGFP. Todas as amostras amplificaram quando testadas com os oligonucleotídeos específicos para *gapdh*, enquanto nenhuma das amostras dos animais tratados com salina ou com 50 μg de pREGFP diluídos em 20 μL água estéril amplificou quando testadas com os oligonucleotídeos específicos para

EGFP. Entretanto, ao menos uma das amostras de cada órgão ou região cerebral dos animais que receberam 25 µg de pREGFP diluídos em 20 µL água estéril apresentou o fragmento com tamanho esperado.

Os dados obtidos nos levam a especular que a solução com concentração de 2,5 µg/µL de pREGFP pode ter sido expelida da cavidade nasal pelo sua viscosidade. A partir destes resultados em todos os experimentos posteriores os animais dos grupos tratados receberam 25 µg de pREGFP em um volume de 20 µL e os animais usados como controle negativo receberam 20 µL de solução salina.

Experimento piloto 2: expressão de EGFP no cérebro

Neste experimento, 2 animais foram tratados com o vetor e um com salina. Após 4 semanas os animais foram sacrificados e os cérebros foram coletados e submersos em solução de paraformaldeído 4% por 12 horas a 4° C. Posteriormente foram submetidos a um gradiente de sacarose, e foram preparadas secções de 4 µm de espessura em criostato. Os cortes foram analisados em microscopia de fluorescência a fim de visualizar a expressão de EGFP.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois não conseguimos encontrar diferença na fluorescência dos cortes dos cérebros dos animais tratados e do controle, já que o tecido apresentou muita autofluorescência basal. Este fato não nos surpreendeu por completo já que a literatura mostra que o SNC possui grande acúmulo de lipofuscina, substância responsável pela autofluorescência basal deste tecido.

Experimento piloto 3: redução da autofluorescência basal

Revisando a literatura, localizamos o trabalho de Stephen et al. (1999), que descrevia dois protocolos para redução da autofluorescência basal. Por questões técnicas

optamos pelo protocolo com Sudan Black B 1% diluído em metanol. Neste experimento foram usados 2 camundongos tratados com pREGFP, 2 tratados com pREGFP diluído em solução 3,6 mM de sulfato de zinco, um com salina e, para podermos detectar qualquer alteração da fluorescência do transgene devido ao tratamento foi usado um camundongo transgênico para EGFP derivado da linhagem C57Bl/6.

Duas semanas após o tratamento os camundongos foram sacrificados e foram realizados cortes com espessura de 4 µm, como descrito previamente. Após a análise foi constatada a redução da autofluorescência basal nos cortes de cérebros dos animais tratados com o vetor e com salina, sem qualquer alteração detectável na expressão de EGFP nos cortes de cérebro do animal transgênico, como apresentado na figura 3.

Neste mesmo experimento não foi detectada qualquer expressão de EGFP nos animais tratados.

Estes resultados nos propiciaram a formulação de duas hipóteses: 1) o transgene não está se expressando ou, 2) a expressão do transgene ocorre em nível muito baixo, impossibilitando a detecção direta.

Para testar estas hipóteses, realizamos um último experimento piloto, descrito a seguir.

Experimento piloto 4 – transcrição do EGFP

No último experimento piloto que precedeu este estudo, foram formados 2 grupos de tratamento: no primeiro foi administrado pREGFP em água estéril em 4

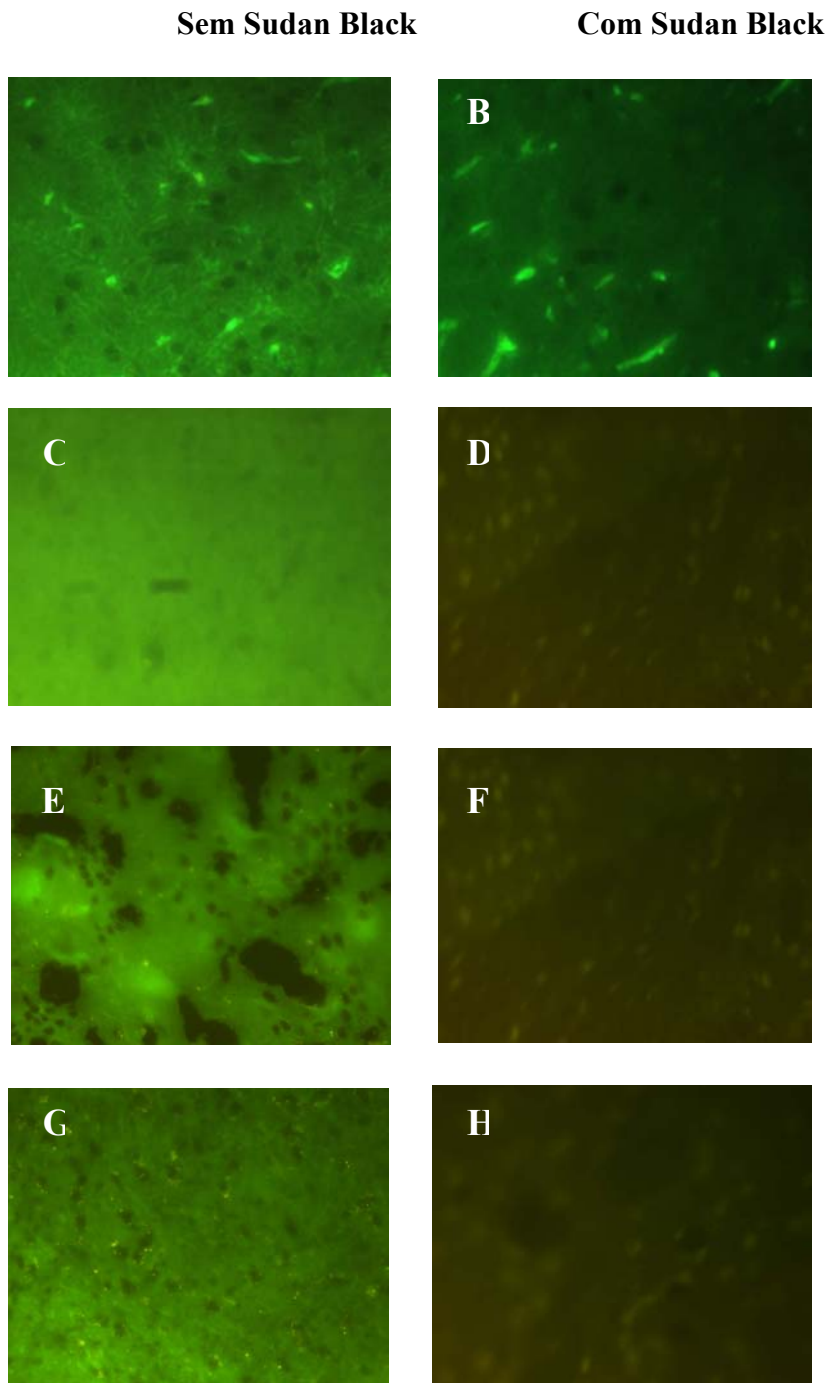


Figura 3 – Microfotografias das amostras de cérebro antes e após o tratamento com Sudan Black B 1% diluído em etanol, em microscopia de fluorescência (400 x). A e B) animais transgênicos, C e D) animais tratados com solução salina, E e F) animais tratados com 25 μ l de pREGFP diluído em água destilada, G e H) animais tratados com 25 μ l de pREGFP diluído em 3,6 mM de sulfato de zinco.

animais, no segundo, pREGFP em solução de zinco 3,6mM em 6 animais. Metade dos animais foi sacrificada uma semana após o tratamento, enquanto que a outra metade foi sacrificada 8 semanas após o tratamento. O cérebro dos animais foi coletado e submetido à extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR. Foi observada a transcrição do gene repórter em todas as amostras testadas de animais tratados, corroborando a hipótese de que a expressão de EGFP é tão sutil que não podemos detectar apenas com o auxílio de microscópio ótico.

Discussão

O presente estudo mostrou o emprego do gene *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) uma das variantes do GFP, para testar a transferência gênica tendo como alvo o encéfalo, através da via nasal. Selecionamos esta via com base em um experimento preliminar realizados em nosso laboratório por Silva et al. (1999) e pelo trabalho de Oh et al. (2001). No primeiro caso, os autores constataram somente pela observação direta em microscópio óptico a expressão de EGFP, 15 dias após a administração de 50 µg de pREGFP a camundongos BALB/c. No segundo caso, os autores observaram a biodistribuição do vetor em diversos tecidos, incluindo o cérebro, utilizando a mesma quantidade do vetor. Na literatura pudemos encontrar inúmeros exemplos de peptídeos e fármacos administrados por esta via com sucesso, muitos encontrados na revisão escrita por Illum (2003).

Na série de experimentos piloto que realizamos, constatamos que o vetor havia chegado até o encéfalo. Outra conclusão que estes experimentos puderam nos mostrar é que uma quantidade inferior àquela usada por Silva et al. (1999) e Oh et al. (2001) também é eficiente. Mas na tentativa de visualização direta da expressão do gene repórter pudemos constatar que o EGFP deve ser usado, preferencialmente, em casos onde o tecido ou órgão alvo possua pouca ou nenhum autofluorescência, para que esta não prejudique a qualidade das análises. Nossa tentativa de eliminar este empecilho, usando o protocolo descrito por Shnell et al. (1999), parece ter sido bem sucedida, já que a fluorescência dos cortes de animais transgênicos para EGFP não parece ter sido afetada. Mas como não tínhamos uma estimativa da eficiência do vetor, não pudemos afirmar se o método é válido também quando a expressão de EGFP é baixa, ou se esta baixa expressão pode ser afetada. Posteriormente, detectamos a transcrição de EGFP

por técnica de RT-PCR, mostrando que o vetor não só havia chegado até o encéfalo como também estava funcional.

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez na literatura disponível, a expressão prolongada de um gene administrado pela via nasal em células do cérebro, sendo levado por um vetor não viral. Estudos anteriores já haviam demonstrado que um plasmídeo podia atingir o encéfalo por esta via, mas analisando um curto espaço de tempo após a administração (Oh et al., 2001 e Han et al 2007). Neste trabalho também é constatada uma grande variação da expressão do transgene em todos os tratamentos, mas em todos os casos esta expressão é observada em duas ou mais regiões do cérebro. A utilização do sulfato de zinco nas condições apresentadas não parece ter aumentado a expressão de EGFP no cérebro como um todo.

A via nasal oferece uma série de mecanismos para a absorção e biodistribuição de moléculas terapêuticas. Neste estudo não conseguimos identificar qual mecanismo usado pelo pREGFP para atingir o cérebro. Outros estudos indicam fortemente que um plasmídeo administrado na cavidade nasal possa chegar até o encéfalo pelo bulbo olfatório (Han et al., 2007), mas não precisamos se o vetor entrou pela via intracelular, utilizando o transporte retrógrado (revisado por Hans et al., 2004), ou pela via paracelular.

Uma série de trabalhos mostra que a via nasal também pode ser usada como via sistêmica, já que moléculas terapêuticas administradas por ela podem alcançar rapidamente a corrente sanguínea com grau muito pequeno de degradação (revisado por Davis et al., 2003). Não descartamos a hipótese de que o pREGFP possa ter atingido o cérebro após entrar na corrente sanguínea.

No presente estudo não foi possível detectar o tipo celular transfectado, por isso não podemos afirmar, com base em nossos resultados, se o tratamento de doenças

neurodegenerativas podem ser realizado por esta via. Também não conseguimos fazer uma avaliação precisa da eficiência dos tratamentos empregados, mas nossos resultados apontam que doenças metabólicas que afetem o encéfalo podem ser tratadas, pois basta que uma pequena parcela da atividade enzimática seja estabelecida para que os sintomas sejam amenizados (Camassola et al., 2005).

Mais estudos com o objetivo de padronizar qual a melhor quantidade de vetor a ser utilizada, o volume e concentração mais adequando da solução com o vetor para ser administrada e comparar a eficiência de outros compostos que podem ser associados ao vetor são de suma importância para a elaboração de um protocolo clínico.

Em conclusão, nossos dados parecem muito animadores, pois mostram claramente que o gene repórter utilizado é capaz de atingir o encéfalo e gerar uma proteína funcional, expressa por um período igual ou maior que 8 semanas. A nossa maior dificuldade foi mensurar esta expressão de maneira mais precisa. A imunohistoquímica fornece informações importantes, pois a presença de células EGFP-positivas no cérebro confirma a expressão da proteína funcional. A quantificação da transfecção e expressão gênica, por outro lado, pode ser mais adequadamente realizada por RT-PCR em tempo real, que está sendo padronizado para complementar a análise. Esta informação deverá confirmar e precisar o grau de transfecção e expressão gênica obtida por administração intranasal do DNA plasmidial.

Referências bibliográficas

- Camassola M, Braga L M, Cañedo A D, Dalberto TP, Matte U, Burin M, Giugliani R and Nardi N B (2005) Nonviral *in vivo* gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. *J Inher Metab Dis*, 28:1035-1043.
- Connelly S (1999) Adenoviral vectors. In: Meager, A., ed.: *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations. From Laboratory to Clinic*. New York: John Wiley, 87-107.
- Davis SS and Illum L (2003) Absorption enhancers for nasal drug delivery. *Clin Pharmacokinet*, 42:1107-1128.
- Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turma J and Celec P (2005) Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 11:110-121.
- Garrett DL, Larson JE, Dunn D, Luis Marrero L and Cohen JC (2003) *In utero* recombinant adeno-associated virus gene transfer in mice, rats, and primates. *BMC Biotechnol*, 3:3-16.
- Graff CL and Pollack GM (2003) P-Glycoprotein attenuates brain uptake of substrates after nasal instillation. *Pharm Res*, 20:1225-30. *Pharm Res*, 2003 20:1225-1230.
- Griesenback U, Cassady RL, Ferrari S, Fukumura M, Müller C, Schmitt E, Zhu J, Jeffery PK, Nagai Y, Geddes DM, Hasegawa M and Alton EFW (2001) The nasal epithelium as a factory for systemic protein delivery. *Mol Ther*, 5: 98-103.
- Han, I K, Kim MY, Byun H M, Hwang TS, Kim JM, Hwang KW, Park TG, Jung WW, Chun T, Jeong GJ and Oh YK (2007) Enhanced brain targeting efficiency of intranasally administered plasmid DNA: an alternative route for brain gene therapy. *J Mol Med*, 85:75-83.
- Herweijer H and Wolff JA (2003) Progress and prospects: naked DNA gene transfer

- and therapy. *Gene Ther*, 10:453-458.
- Illum L (2003) Nasal drug delivery - possibilities, problems and solutions. *J Control Release*, 87:187-198.
- Jakobsson J and Lundberg C (2006) Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol Ther*, 13:484-493.
- Jerusalmi A, Morris-Downes MM, Sheahan BJ and Atkins GJ (2003) Effect of intranasal administration of Semliki Forest virus recombinant particles expressing reporter and cytokine genes on the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther*, 8:886-894.
- Li Y, Wang X, Guo H and Wang S (2004) Axonal transport of recombinant baculovirus vectors. *Mol Ther*, 10:1121-1129.
- Loftus LT, Li H F, Gray AJ, Hirata-Funkae C, Stoica BA, Futami J, Yamada H, Aisen PS and Matsuoka Y (2006) In vivo protein transduction to the CNS. *Neuroscience*, 139: 1061-1067.
- McCormack JE, Edwards W, Sensintaffer J, Lillegren L, Kozloski M, Brumm D, Karavodin L, Jolly DJ and Greengard J (2001) Factors affecting long-term expression of a secreted transgene product after intravenous administration of a retroviral vector. *Mol Ther*, 3:516-525.
- Misra A, Ganesh S, Shahiwala A and Shah SP (2003) Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 6:252-73
- Nardi NB, Teixeira LAK and Silva EFA (2002) Terapia gênica. *Ciênc Saúde Colet*, 7: 109-116.
- Oh Y, Kim J, Hwang TS, Ko JJ, Kim JM, Yang J and Kim C (2001) Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine*, 19:4519-4525.

- Pagès JC and Bru T (2004) Toolbox for retrovectorologists. *J Gene Med*, 6:S67-82.
- Pardridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2:3-14.
- Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L and Sheridan (2003) Nonviral gene delivery: techniques and applications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Méd*, 5:1-15.
- Pringle IA, Raman S, Sharp WW, Cheng SH, Hyde SC and Gill DR (2005) Detection of plasmid DNA vectors following gene transfer to the murine airways. *Gene Ther*, 12:1206-1214.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, EUA. 2a edição.
- Silva EA, Alves T, Silva F. H, Braga L and Tavares, A. (2002). Expressão da proteína repórter EGFP em cérebro de camundongo após administração nasal de DNA plasmidial. In: XXXI Congresso Argentino de Genética, , La Plata. *Journal of Basic and Applied Genetics - Journal of the Argentine Society of Genetics*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Genética, v. XV. p. 40-41.
- Smith KR (2003) Gene Therapy: theoretical and bioethical concepts. *Arch Med Res*, 34: 247-268.
- Stephen AS, William AS and Martin WW (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem*, 79: 719-730.
- Tanaka SI, Yamakawa T, Kimura M, Aoki I, Kamei I, Okuda K and Mobbs C (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res Clin Pract*, 63:1-9.
- Teixeira LAK, Fricke CE, Bonorino CB, Bogo MR and Nardi NB (2001) An efficient

gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol*, 88:159-165.

Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V and Frey WH (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 127:481-496.

Tucker SN, Lin K, Stevens S, Scollay R, Bennett MJ and Olson DC (2004) Salivary gland genetic vaccination: a scalable technology for promoting distal mucosal immunity and heightened systemic immune responses. *Vaccine*, 22:2500-2504.

Wong LF, Azzouz M, Walmsley LE, Askham Z, Wilkes FJ, Mitrophanous KA, Kingsman SM and Mazarakis ND (2004) Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Mol Ther*, 9:101-11.

Woodley TD, Keene DR, Atha T, Huang Y, Ram R, Kasahara N and Chen M (2004) Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther*, 10:318-326.

Xie Y, Ye L, Zhang X, Cui W, Lou J, Nagai T and Hou X (2005) Transport of nerve growth factor encapsulated into liposomes across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo studies. *J Contr Rel*, 105:106-119.