

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Desenvolvimento de um protocolo pré-clínico para terapia gênica
in vivo de Mucopolissacaridose do tipo I.

Melissa Camassola

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

Orientadora : Prof. Dra. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre

Maio de 2004

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de imunogenética do Departamento de genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Instituições financiadoras:

CNPq
FAPERGS
CAPES

Agradecimentos:

À Professora Nance:

Se você pode imaginar,
também pode realizar.
Se você pode sonhar,
também pode ser.
(William Arthur Ward)

Muito obrigada, simplesmente
por quem tu és!

À minha amiga Luisa,
pelo companherismo,
por fazer muito deste proj
acontecer e
pelo exemplo de
determinação.

À Eve, Mogui e ao Mica,
por cuidarem tão bem do
meu TESOURO.
À Jô e ao Claude, por me
darem esse presente
maravilhoso.
À Elisinha, desculpas por
tanta ausência assim, bem
no início.
À família do Joce, por pela
agradável convivência.

Ao Tiago e à Mari, que sabem
que sempre é possível (veremos pRIDUA no final).
Ao Andres, por compartilhar seus conhecimentos.
Aos personagens, Pedro, Flavinha e Tati,
pelas boas idéias e pela disposição.
Ao Elmo e a Élen, por terem tanta paciência.
Ao Serviço de Genética do Hospital de Clínicas,
em especial à Maira, Marli, Roberto e Úrsula.
Ao Tiago pela ajuda estatística.

Aos demais colegas do Curso de Pós Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS..

Aos demais colegas do Laboratório de
Imunogenética, Cami, Ed, Ale, Daniel (1), Daniel
(2), Déia, Paula, Andrei, Lindolfo, Aline, Igor,
Dona Dilma, Dênis, Beta, Kátia, Marion e Zeca,
por fazerem o nosso Lab tão gostoso de se
estar.

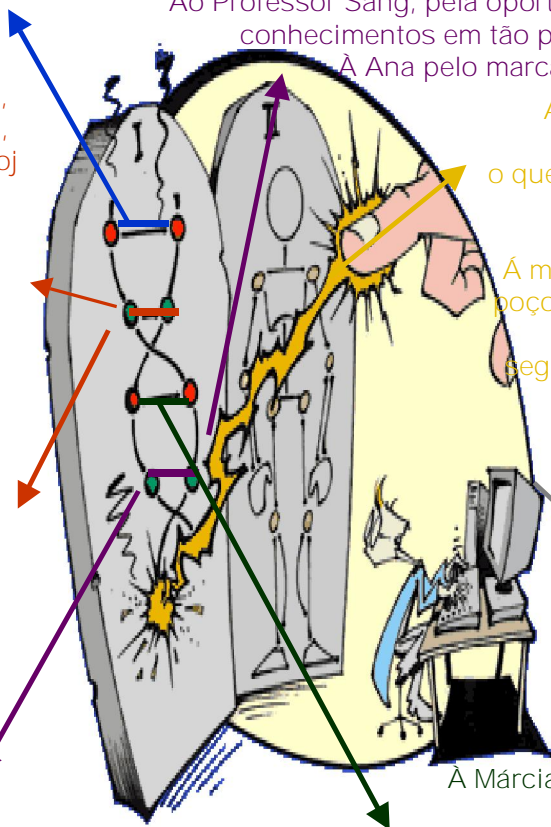
Ao pessoal do laboratório de *Drosophila*, por
tantos empréstimos. À Sílvia, pelas fotografias.
Ao Professor Sang, pela oportunidade de tantos
conhecimentos em tão pouco tempo.

À Ana pelo marcador.

Ao meu pai, o qual
mantenho
o que disse na oitava série:
ele sempre
será um herói.
À minha mãe, por ser um
poço de caridade, carinho,
amor,
segurança e por ser meu
TESOURO.

Ao meu Joce amado,
por me manter forte
até o final.

A Márcia, Vânia, Fernando,
Clarissa,
por serem uma família durante
algum tempo.
À Cris e ao Arno, pela acolhida.
À Linfocito e a Lia, por
momentos de pura alegria.
À Adri, pelo exemplo de
amizade.



Sumário

| Tópico | Página |
|--|--------|
| Resumo..... | 7 |
| Abstract | 8 |
| Introdução..... | 9 |
| Objetivos | 20 |
| Nonviral <i>in vivo</i> gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model | 22 |
| Informações Complementares Aos Resultados..... | 45 |
| Discussão | 54 |
| Referências Bibliográficas..... | 58 |

Lista de abreviaturas

Ad - Adenovirus

AAV – Adeno-associated virus

PEI – polyethylenimine

EBV - Epstein Barr virus (EBV)

X (SCID) – X-linked severe combined immunodeficiency

MPS – Mucopolysaccharidosis

IDUA - α -L-iduronidase

GAGs - glycosaminoglycans

KO - knockout

iv – intravenous injection (hydrodynamic injection)

ip - intraperitoneal injection

FIV – feline immunodeficiency virus

RESUMO E ABSTRACT

Resumo

A Mucopolisacaridose tipo I é uma doença lisossomal caracterizada pela deficiência de α -L-iduronidase (IDUA), que é responsável pela degradação de glicosaminoglicanos (GAGs). Esta deficiência leva ao acúmulo de dermatan e heparan sulfato nos lisossomos. Atualmente, os tratamentos disponíveis envolvem transplante de medula óssea e terapias de reposição enzimática que são limitadas em seus efeitos. Neste trabalho, camundongos nocaute (KO) para o gene IDUA (gentilmente fornecidos pela Dr. Elizabeth Neufeld, UCLA) foram tratados com um vetor nonviral contendo cDNA *IDUA* humano (pRIDUA). Os camundongos KO foram transfectados através de injeção hidrodinâmica pRIDUA na veia caudal (iv, n = 3) ou por injeção intraperitoneal de complexos pRIDUA/Superfect (ip, n = 3). A acumulação de GAGs foi medida nos rins, baço, pulmões, cérebro e fígado; atividade de IDUA foi analisada nos órgãos. A expressão de IDUA também foi analisada nos órgãos por RT-PCR. A concentração de GAGs nos órgãos foi diferente entre KO e camundongos normais. No baço, níveis de GAGs foram significativamente mais baixos em camundongos KO tratados iv comparando com o grupo KO sem tratamento. O RT-PCR mostrou amplificação do cDNA *IDUA* em todos órgãos dos camundongos KO ambos tratados por iv ou ip. Os resultados mostram atividade da enzima nos mesmos órgãos analisados (principalmente no baço, cérebro e pulmão). Estes dados sugerem que o transgene é expresso nos órgãos dos camundongos KO tratados ip ou iv com pRIDUA. Este tipo de transfecção pode ser uma ferramenta útil para protocolos não-virais de terapia de gene de MPS.

Abstract

Mucopolysaccharidosis I is a lysosomal disorder characterized by deficiency of α -L-iduronidase (IDUA), which is responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). This deficiency leads to accumulation of dermatan and heparan sulphate on lysosomes. Presently, available treatments involve bone marrow transplantation and enzyme replacement therapies which are however limited in their effects. In this work, knockout (KO) MPS I mice (gently provided by Dr Elizabeth Neufeld, UCLA) were treated with a nonviral vector with the human *IDUA* cDNA. KO mice were transfected with by hydrodynamic injection of pRIDUA in the caudal vein (iv, n = 3) or by intraperitoneal injection of pRIDUA/Superfect complexes (ip, n = 3). GAG accumulation was measured in the kidneys, spleen, lungs, brain and liver; IDUA activity was analyzed in the organs. The expression of IDUA was also analyzed in the organs by RT-PCR. The concentration of GAGs in the organs was different between KO and normal mice. In the spleen, however, GAGs levels were significantly lower in KO mice treated iv with pRIDUA than in control KO. RT-PCR showed amplification of IDUA cDNA in all organs of the KO mice both treated by iv and ip. The results show enzyme activity in the same the organs analyzed (specially in spleen, brain and lung). These data suggest that the transgene is expressed in the organs of KO mice treated ip or iv with pRIDUA. This kind of transfection may be a useful tool for non-viral protocols of gene therapy of MPS.

INTRODUÇÃO

Introdução

A terapia gênica surgiu como uma promessa para revolucionar a medicina, sendo aplicada em doenças nas quais a prevenção e tratamento são limitados por métodos tradicionais. Inicialmente este tipo de terapia foi proposto para corrigir defeitos genéticos; atualmente, estudos mostram suas aplicações no tratamento de várias outras patologias como o câncer e doenças neurodegenerativas, infecciosas e cardíacas.

A terapia gênica permite a adição do material genético terapêutico, suprindo deficiências ou inibindo a expressão de certos genes nas células somáticas humanas. O gene de interesse, também chamado de transgene, encontra-se em uma molécula de DNA ou RNA junto com outros elementos genéticos, como sistemas de expressão e de manutenção, que garantirão sua funcionalidade. Estes elementos compõem o vetor, que leva o transgene para as células alvo.

Os vetores podem ser usados para transferência gênica em cultura de células (*in vitro*), diretamente no indivíduo (*in vivo*) ou em células retiradas do paciente, modificadas em cultura e reintroduzidas no mesmo (*ex vivo*). Para alguns tipos de tratamentos pode ser usada ainda a transferência do vetor diretamente no local de interesse (*in situ*).

Para uma eficiente transferência, os genes devem ser direcionados especificamente às células alvo, sem que ocorra degradação no soro nem no sítio de injeção. Os genes devem, então, entrar em contato com as células alvo, interagir com as membranas celulares e suportar a transferência para o interior das células. Em alguns casos, os genes necessitam cruzar a membrana nuclear e ser processados para uma transcrição e tradução eficientes. De qualquer modo, quando estes sistemas genéticos são administrados *in vivo*, eles inevitavelmente encontram barreiras biológicas (Kim e cols., 2001).

As barreiras que os genes encontram são dependentes da rota de administração. No caso de administração sistêmica, por exemplo, alguns sistemas de transferência não virais são facilmente eliminados pelo sistema reticuloendotelial. Interações com componentes presentes nos fluídos do corpo, tais como proteínas do soro, podem afetar fortemente o destino dos genes

transferidos *in vivo* com vetores não-virais, modificando assim a distribuição nestes tecidos. Em alguns casos, genes não podem alcançar o órgão-alvo devido a barreiras biológicas naturais, tais como a barreira hemato-encefálica ou o epitélio intestinal. A degradação do vetor por digestão enzimática, por nucleases, pode também impedir a transferência gênica. Deste ponto de vista, é importante desenvolver sistemas de transferência gênica que possam permanecer estáveis até alcançarem o sítio-alvo e serem capazes de liberar o DNA durante a interação com as células alvo. Além disso, depois de ultrapassar a membrana celular, o transgene pode ser seqüestrado dentro de um compartimento da célula, ocorrendo assim a sua degradação, ao invés de atingir o seu alvo intracelular (Kim e cols., 2001).

Um importante passo para terapia gênica é o desenvolvimento de vetores eficientes para a transferência gênica. O vetor ideal deve apresentar algumas características como manter a expressão do transgene a longo prazo, não promover reações imunológicas contra os produtos de expressão, não causar toxicidade para o paciente, manter a segurança do ambiente, ter baixo custo, não ter replicação autônoma e ser específico para a célula alvo a ser tratada (Nardi e cols., 2002). Muitos laboratórios estão avaliando diferentes tipos de vetores virais e não virais para melhorar a eficiência e a estabilidade da transferência gênica. Vantagens e desvantagens destes sistemas estão resumidas na Tabela I.

Sistemas Virais

Diferentes tipos de vírus estão sendo adaptados como vetores, mas os estudos estão mais avançados com os retrovírus (incluindo os lentivírus), adenovírus (Ad) e vírus adeno-associados (AAV). O primeiro passo para o desenvolvimento de um vetor viral é a identificação das seqüências gênicas que são necessárias para a montagem das partículas virais, para o empacotamento do genoma viral dentro destas partículas e a para a transferência às células alvo. Como próximo passo os genes não essenciais são deletados para reduzir a patogenicidade e a resposta imune. O genoma viral restante e o transgene serão os componentes do vetor a ser construído.

Tabela I: Vantagens e desvantagens de transferência gênica por vetores virais e não virais.

| Sistema de Transferência Gênica | Exemplos de vetores | Vantagens | Desvantagens |
|---------------------------------|---|--|--|
| Viral | Adenovirus, Adeno-associado, Retrovirus, Herpes simples, Etc. | Alta taxa de eficiência de transdução, expressão prolongada do transgene e infecção em variados tipos celulares. | Restrição no tamanho do transgene a ser inserido, podem estimular resposta imune, problemas na segurança, toxicidade e na sua produção em grande escala. |
| Não Viral | Lipídeo catiônico, Lipossomo, Polímero, Peptídeos, etc. | Fácil manipulação, fácil produção em grande escala, flexibilidade na inserção do transgene, quanto ao tamanho, seguro, não imunogênico e não patogênico. | Expressão por pouco tempo e instabilidade causada devido a componentes do soro quando administrados <i>in vivo</i> . |

(Kim e cols., 2001)

Vetores virais podem ser divididos em duas classes gerais: (a) vetores com capacidade de integração no genoma das células hospedeira, promovendo uma expressão a longo prazo do transgene, e (b) vetores que não se integram. Exemplos de vetores que se integram são os retrovírus e adeno-associados. Atualmente, o principal vírus aplicado à terapia gênica sem a capacidade de integração é o adenovírus, o qual tem seu genoma viral mantido em forma episomal no interior da célula infectada.

1) Adenovírus (Ad): são capazes de carregar transgenes de tamanho grande (maiores que 8 kb) sem afetar sua infectividade. Os Ad possuem baixa especificidade para a célula hospedeira, caracterizando-se por infectar um grande espectro de tecidos. Infectam tanto células que estão se dividindo quanto células em estado de quiescência. Estudos mostram que, apesar de não serem vírus integrativos, a expressão do transgene transportado pode permanecer por até um

ano (Smith, 2003). Entre os obstáculos à aplicação do Ad, *in vivo*, estão: a resposta imune celular contra as células transduzidas que expressam baixos níveis de genes de origem viral resultando na eliminação destas células; a imunidade humoral contra o capsídeo viral, que limita aplicações repetidas do vírus; e o potencial de contaminação com adenovírus capazes de replicação (Connelly, 1999).

2) Adeno-associados: os AAV são parvovírus humanos, não patogênicos, que naturalmente requerem um *helper* vírus o qual contém todos genes necessários para mediar sua replicação. Seu genoma é composto de DNA fita simples e não está envelopado. Este tipo de vetor tem um suporte de adição do transgene de aproximadamente 5,0 kb, o que representa uma importante limitação de uso. O vírus selvagem tem a capacidade de se integrar em uma região específica do cromossomo 19. A produção de AAV em grande escala é um processo complexo e trabalhoso e sua infecção é um processo complicado (Snyder e col. 2002). O uso destes vetores ainda requer muitos estudos, direcionados ao desenvolvimento de vetores cada vez mais específicos em relação a sua região de integração (Smith, 2003).

3) Retrovírus: os retrovírus são vírus de RNA que ao replicar-se formam moléculas de DNA dupla fita. Neste momento, são chamados provírus. Os retrovírus infectam as células alvo diretamente pela interação entre a proteína de envelope viral e um receptor de superfície na célula alvo, integrando-se em regiões não específicas do genoma da célula hospedeira (Robbins e cols, 1998).

Sistemas Não Virais

Os métodos de transferência dos vetores não virais estão divididos em duas categorias: físicos e químicos.

1. Métodos Físicos: estes métodos são mais utilizados para a transferência de vetores plasmidiais.

1.1) Microinjeção

Um dos primeiros métodos a ser utilizado, este sistema consiste de injeção direta do DNA na célula alvo. Apesar de vantajoso, devido à pequena quantidade de DNA necessária para a transferência, é extremamente trabalhoso e apresenta baixo rendimento (Nardi e cols., 2002).

1.2) Eletroporação

Neste sistema, pulsos elétricos alternados são aplicados às células que estão em contato com uma solução de DNA plasmidial. A corrente gerada é capaz de formar poros na superfície celular, facilitando a entrada do material genético nas células. Este método foi recentemente adaptado para utilização *in vivo*, aumentando a eficiência da injeção de DNA nu. Entretanto, a introdução de plasmídeos *in vivo* geralmente acarreta uma elevada resposta imune tanto contra o transgene, quanto contra toda a molécula de DNA. Conseqüentemente, estes sistemas vêm sendo muito utilizados para o desenvolvimento de vacinas de DNA (Gehl, 2003).

1.3) Biobalística (*gene gun*)

Outro método de grande importância é a biobalística ou *gene gun* (do inglês, arma genética), onde o DNA, associado com microesferas de ouro ou tungstênio, é acelerado por um gás carreador que projeta estas esferas contra as células e promove a entrada dos mesmos no núcleo das células bombardeadas. Este sistema é bastante eficiente, e vem sendo adaptado para utilização *in vivo* nas vacinas de DNA (Pouton e col., 1998).

1.4) Injeção Hidrodinâmica :

A transferência intravenosa de genes é um método bastante atrativo. A principal vantagem deste tipo de transferência é quanto a sua forma de administração que pode ser sistêmica ou regional. A forma regional se faz através da injeção do DNA dentro dos vasos que suprem de sangue a região de interesse. Um grande avanço na forma sistêmica foi obtido por Liu e cols. (1999), com o desenvolvimento de um procedimento de transferência usando injeção na veia caudal de camundongos. Neste método a injeção, denominada hidrodinâmica, usa um grande volume de solução contendo o DNA de interesse (aproximadamente 10% do peso corporal do animal). As moléculas de DNA entram na corrente sanguínea e são carregadas para o interior do coração e então distribuídas para o restante do corpo. O uso deste método resulta em expressão do transgene predominantemente no fígado, mas também no coração, pulmão, baço e rim. Neste modelo a administração do vetor pode causar danos,

mas as reações patológicas são transientes e a morfologia do fígado é restaurada até o quarto dia de manipulação.

Uma pergunta freqüente é como esta técnica pode ser transposta para humanos. Estudos atuais mostram uma eficiência parecida quando macacos receberam injeções de DNA no dentro de vasos eferentes ou aferentes do fígado. Tais injeções poderão ser feitas em humanos via cateteres (Herweijer e col., 2003).

2) Métodos químicos: geralmente empregam materiais sintéticos que formam complexos com o transgene de interesse. Tais complexos são formados devido à interação das cargas positivas destes compostos (catiônicos) e as cargas negativas dos grupamentos fosfato das moléculas de DNA e RNA. O complexo ainda adquire características para interagir com a membrana celular e facilitar a entrada do material genético nas mesmas. A entrada deste complexo na célula ocorre na maioria das vezes por processos normais como a endocitose.

Estes compostos atualmente recebem nomes muito diferentes por seus produtores, mas foi estabelecido um padrão de nomenclatura para estes sistemas de transferência gênica por métodos químicos, com objetivo de simplificar, harmonizar e integrar estes variados sistemas (Kim e cols., 2001) (Tabela II).

2.1) Sistemas baseados em lipídeos :

Tais métodos usam lipídeos catiônicos, os quais são capazes de formar complexos com moléculas de ácidos nucleicos. Embora existam variações nas estruturas destes lipídeos, todos são hidrofóbicos. Os lipossomos são pequenas vesículas de fosfolipídeos bipolares, eficientes carreadores de drogas, peptídeos e proteínas, amplamente estudados para uso em terapia gênica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Possuem como desvantagem a perda da estabilidade do complexo DNA/lipossomo (Pouton e cols., 1998).

2.2) Polímeros: entre eles estão polietileneimina (PEI), dendrímeros (Superfect), poli (L-lisina), polímeros contendo imidazol, quitosan, etc. Entre suas vantagens estão a possibilidade da escolha da estrutura do polímero ideal para a transfecção da célula alvo e a fácil obtenção em grande escala (Pouton e cols., 1998).

Tabela II: Terminologia sugerida para sistemas químicos para transferência gênica de vetores não-virais.

| Terminologia recomendada | Significado | Terminologia na Prática |
|--------------------------|--|--|
| Lipofecção | Transferência gênica por lipídeos catiônicos. | Transfecção usando lipídeos catiônicos. Transfecção usando lipossomos catiônicos. Citofecção Anfifecção |
| Polifecção | Transferência de ácidos nucleicos pela condensação de DNA utilizando polímeros catiônicos. | Transfecção de DNA mediada por condensação do DNA usando polímeros catiônicos. PEI Dendrímeros Peptídeos catiônicos, etc. |
| Lipoplex | Complexo formado entre ácido nucleico e lipídeo catiônico. | Citossomos, Lipossomos, partículas nucleofílicas, Complexos DNA-lipídeos catiônicos, complexo DNA-lipídeo, etc. |
| Poliplex | Complexo DNA-polímero catiônico. | Conjugados Moleculares de DNA com polilisina, PEI, dendrímeros, peptídeos catiônicos, etc. |

2.3) A co-precipitação de DNA com fosfato de cálcio foi um dos primeiros sistemas descritos para transferência gênica. Apresenta como vantagens a alta segurança, a simplicidade e baixo custo. No entanto, a eficiência e reprodutibilidade deste método são muito baixas. Apesar disso, procedimentos de transferência gênica com fosfato de cálcio são importantes até hoje, sendo bastante utilizados na produção de vetores virais.

Como descrito acima, as técnicas de transferência de vetores não virais incluem administração de DNA nu, através de pulsos elétricos e mediada por partículas de ouro ou tungstênio, e ainda o DNA complexado com macromoléculas sintéticas. Cada um destes métodos possui vantagens e

desvantagens, tais como baixa imunogenicidade, baixo custo, fácil manipulação, etc, mas a desvantagem comum é a baixa eficiência de transfecção usando plasmídeos convencionais. Para o melhoramento dos sistemas de transferência não virais, plasmídeos baseados em vírus Epstein Barr (EBV) têm sido testados. Estes plasmídeos contêm elementos virais responsáveis pela replicação independente do plasmídeo no interior do núcleo das células alvo, minimizando os efeitos da diluição do plasmídeo após inúmeros ciclos de divisão celular e proporcionando uma expressão estável do transgene, além da resistência a antibióticos (Marechal e cols., 1999; Craenenbroeck e cols., 2000; Stoll e cols., 2001).

Aplicações da terapia gênica

Com estudos baseados nos tipos de vetores e técnicas apresentados no texto acima, chegamos ao final da primeira década de terapia gênica e os primeiros resultados de sua eficácia clínica são animadores. Recentemente, benefícios clínicos foram claramente demonstrados e grandes progressos estão surgindo na seleção e melhoramento de vetores, existindo assim perspectivas de que esta segunda década da terapia gênica mostre um potencial ainda maior para aplicações clínicas.

Estes primeiros estudos clínicos envolvendo terapia gênica começaram em 1990 e desde então a terapia gênica tem se tornado o foco de toda uma nova indústria. Por exemplos, em 2000 Cavazzana-Calvo e cols. descreveram resultados estimulantes, que estão sendo obtidos em ensaios clínicos de terapia gênica. Os autores descreveram o tratamento bem sucedido de nove crianças dentro de um grupo total de dez portadoras de imunodeficiência severa ligada ao X (SCID) causada pela deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA). Eles trataram células tronco hematopoéticas (CD34⁺ e capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares do sangue) contidas na medula óssea destas crianças através da incubação *ex vivo* com vetor retroviral carregando o transgene. As células tronco transduzidas foram reinfundidas nos pacientes. Dez meses depois das crianças terem recebido as células tronco transduzidas, o número de células T, B e NK do sistema imune foi considerado normal. Clinicamente, os pacientes

melhoraram, e após três meses de tratamento as crianças foram capazes de viver em casa, e não isoladas no hospital.

Inúmeras doenças genéticas são potencialmente passíveis de serem tratadas e/ou prevenidas via terapia gênica, sendo as doenças de herança monogênica aquelas onde a aplicação dessa alternativa terapêutica é mais óbvia. As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças monogênicas que apresentam alterações da produção de enzimas lisossômicas capazes de degradar mucopolissacarídeos (ou glicosaminoglicanos). Algumas formas clínicas de MPS já foram identificadas e descritas, sendo classificadas numericamente de MPS I a MPS VII, cada uma resultando de mutações em genes de enzimas específicas. Entre as MPS estudadas, a MPS I é uma das melhores caracterizadas. A mucopolissacaridose do tipo I é uma doença autossômica recessiva, resultante de um defeito no gene que codifica a enzima lisossomal α -L-iduronidase (IDUA), que degrada os glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato. O fenótipo desta doença pode ser muito variável. Indivíduos com baixos níveis de IDUA ou ausência da mesma apresentam efeitos deletérios na infância e pré-adolescência devido ao acúmulo de GAGs em diferentes órgãos, incluindo o sistema nervoso central, sistema reticuloendotelial e esqueleto. Na maioria dos casos os pacientes apresentam disfunção neurológica progressiva. Tais pacientes são severamente afetados ainda na primeira década de vida (Zheng e cols., 2003).

A terapia principal para MPS I é o transplante de medula óssea de um indivíduo normal para um afetado (neste caso, a principal desvantagem é a dificuldade de encontrar doador com HLA compatível) (Vellodi e cols. 1997). A reposição enzimática é outra alternativa atualmente aplicada para MPS I, mas esta técnica não mostrou reverter os casos de comprometimento neurológico, além de ser um método de alto custo (Kakkis e cols., 2001).

A aplicação de terapia gênica para MPS I apresenta-se como uma alternativa promissora, e diferentes tipos de vetores estão sendo estudados nestes contexto (Baxter e cols., 2002, Zheng e cols., 2003). Experimentos tentando estabelecer protocolos para a terapia gênica da MPS I têm sido publicados. Zheng e cols. (2003), desenvolveram um protocolo pré-clínico para um modelo murino de MPS I, usando um vetor retroviral para transdução de

células de medula óssea, e mostraram que estas células migram até o cérebro. Em humanos, estudos iniciais mostraram a possibilidade de transfectar fibroblastos com o gene da IDUA (Anson e cols., 1992), e estudos posteriores *in vitro* mostraram também a possibilidade de transfectar células CD34⁺ de medula óssea normal ou de pacientes com MPS I (Huang e cols., 1997). Entretanto, problemas com a manutenção da expressão do gene nas células transfectadas tornaram-se aparentes.

Outras mucopolissacaridoses têm recebido também atenção para estudos de terapia gênica.

OBJETIVOS

Objetivos

Um progresso significativo tem sido alcançado durante os últimos anos no planejamento da terapia gênica, em termos de eficiência de transferência, direcionamento às células alvo e segurança. Entretanto, ainda são necessários muitos estudos, devido ao grande espectro de doenças que podem ser tratadas. Até o momento, o principal fator limitante é a ineficácia dos sistemas de transporte dos transgenes, e os esforços para encontrar sistemas genéticos mais eficientes, capazes de atingir as células alvo com segurança e na dose ideal, continuam. Este projeto visa colaborar com a busca de informações sobre formas de transferência gênica no estabelecimento de protocolos pré-clínicos adequados para mucopolissacaridose do tipo, repondo a atividade da enzima α -L-iduronidase através da transferência do gene IDUA em um modelo murino da doença. Para isso os seguintes objetivos foram propostos:

- 1) Construção de um vetor plasmidial de transferência gênica carregando o gene IDUA humano, que codifica a enzima α -L-iduronidase.
- 2) Análise de diferentes vias, intraperitoneal e intravenosa (hidrodinâmica), para a transferência gênica *in vivo* em camundongos nocaute para o gene IDUA, e que representam um modelo murino para MPS I.
- 3) Análise do sucesso da transferência gênica, através da avaliação da expressão gênica, atividade da enzima, acúmulo do substrato e quadro clínico.

Nonviral *in vivo* gene transfer in the mucopolysaccharidosis I
murine model

Melissa Camassola^{a*}, Luisa de Macedo Braga^a, Andrés Delgado Cañedo^a, Tiago
Dalberto Pires^a, Ursula Matte^b, Maira Burin^b, Roberto Giugliani^b, Nance Beyer
Nardi^a

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre,
RS, Brazil

Research supported by: FAPERGS, CAPES, CNPq

*Correspondence to: Melissa Camassola

Departamento de Genética

Caixa Postal 15053, 91501-900, Porto Alegre RS, Brasil

Phone number: +55(51)33166737

Fax number:+55(51)33167311

email: camassola@yahoo.com.br

number of words: 3,719

Title for footnotes: NONVIRAL IN VIVO GENE TRANSFER IN MPS I

(Trabalho a ser submetido à revista Molecular Genetics and Metabolism)

Abstract

Mucopolysaccharidosis I is a lysosomal disorder characterized by deficiency of α -L-iduronidase (IDUA), which is responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). This deficiency leads to accumulation of dermatan and heparan sulphate on lysosomes. Presently, available treatments involve bone marrow transplantation and enzyme replacement therapies which are however limited in their effects. In this work, knockout (KO) MPS I mice (gently provided by Dr Elizabeth Neufeld, UCLA) were treated with a nonviral vector with the human *IDUA* cDNA. KO mice were transfected with by hydrodynamic injection of pRIDUA in the caudal vein (iv, n = 3) or by intraperitoneal injection of pRIDUA/Superfect complexes (ip, n = 3). GAG accumulation was measured in the kidneys, spleen, lungs, brain and liver; IDUA activity was analyzed in the organs. The expression of IDUA was also analyzed in the organs by RT-PCR. The concentration of GAGs in the organs was different between KO and normal mice. In the spleen, however, GAGs levels were significantly lower in KO mice treated iv with pRIDUA than in control KO. RT-PCR showed amplification of IDUA cDNA in all organs of the KO mice both treated by iv and ip. The results show enzyme activity in the same the organs analyzed (specially in spleen, brain and lung). These data suggest that the transgene is expressed in the organs of KO mice treated ip or iv with pRIDUA. This kind of transfection may be a useful tool for non-viral protocols of gene therapy of MPS.

Introduction

The mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal monogenic disorders that involve deficiency of lysosomal enzymes which are responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). Several clinical forms of MPS have already been identified, being numerically classified as MPS I to MPS VII, each resulting from mutations in genes of specific enzymes. Mucopolysaccharidosis type I, the most frequent and the best characterized, is a recessive monogenic disorder resultant of a defect in the gene that encodes the lysosomal enzyme α -L-iduronidase (IDUA), which degrades the GAGs heparan and dermatan sulfate. Patients present variable phenotypes. Individuals with low levels or absence of IDUA have several problems in the childhood due to the accumulation of GAGs in specific organs, such as the spleen, liver, skeleton and nervous and reticuloendotelial systems. In most cases the patients present progressive neurological dysfunction, and many die in the first decade of life [1].

Presently, transplantation of normal bone marrow represents the major form of therapy for MPS I. Its main disadvantage is the difficulty of finding HLA-compatible donor [2]. Enzyme replacement is another alternative applied for MPS I at present, but this approach does not revert the cases of neurological compromise, and is also limited by its high cost [3]. The application of gene therapy for MPS I arises as a promising alternative, and different kinds of vectors are being investigated [4, 5]. Zheng et al. (2003) [5] developed a preclinical gene therapy protocol for a murine model of MPS I, using a retroviral vector for the transduction of bone marrow cells, which were shown to migrate to brain after

reinfusion into the mice. The results showed that the production of even a small amount of the normal enzyme is capable of partially correcting the phenotype. In humans, initial results have shown the possibility to transfect fibroblasts with the *IDUA* gene [6] and more recent investigations showed that normal or MPS I CD34+ bone marrow cells can be transfected [7]. Problems with the maintenance of the expression of the transgene in the transfected cells, however, became apparent.

An important step for gene therapy is the development of efficient vectors for gene transfer. The ideal vector should maintain transgene expression for long periods, be environmentally safe, present low production cost, no autonomous replication and specificity for the target cell; furthermore it should not induce immunological reactions against itself or the protein products or cause toxicity for the patient [8]. Viral vectors usually possess high efficiency of transfection when compared with nonviral systems, but nonviral vectors present lower toxicity, immunogenicity and production cost, and are easier to produce in large scale.

The transference of nonviral vectors include the administration of naked DNA, through electric pulses or biobalistics, and of DNA molecules complexed with synthetic, polymeric macromolecules. The *in vivo* expression of exogenous genes by direct injection of plasmid DNA was first shown by Herweijer et al. in 1990 [9]. In 1999, Liu et al. [10] used naked DNA with systemic administration in mice of a reporter gene through hydrodynamic injection, obtaining high expression in different organs, particularly the liver. Each of these approaches have advantages and disadvantages, but the common problem is the transient expression of the vector, particularly when conventional plasmids are used. To

improve nonviral transference systems, plasmids based in the Epstein Barr virus (EBV) have been tested. These vectors contain viral elements responsible for the independent replication of the plasmid in the interior of the nucleus of the target cell, minimizing the effects of its dilution after cellular division, providing a stable expression of the gene for a longer time and also resistance to antibiotics [11, 12, 13].

Several animal models (canine, feline or murine) can be employed for the study of the pathology and treatment of MPS I. The murine model presents evident advantages over others models because of their small size, easier manipulation and short life span. We tested the efficiency of a nonviral gene transfer system in a preclinical protocol of MPS I, using a plasmid based in EBV in a murine model knockout for the *IDUA* gene.

Materials and methods

Mice

C57Bl/6 knockout mice, deficient for α -L-iduronidase (IDUA-KO), represent a murine model for human mucopolysaccharidosis type I (MPS I). IDUA-KO were derived from animals kindly provided by Dr Elizabeth Neufeld (UCLA, Los Angeles, CA, USA). The mice were produced by targeted disruption of the murine IDUA gene [14]. The colony is kept by breeding heterozygous animals, and homozygous mutants were identified at birth by polymerase chain reaction [15]. The animals were kept in standard conditions, and used in the experiments at 5 months of age.

Construction of pRIDUA

A *Hind*III/*Bam*HI fragment containing the total span of the human *IDUA* cDNA in Ph 2.1, also provided by Dr Elizabeth Neufeld, was subcloned in the mammalian expression vector pREP9 (Invitrogen Corp., San Diego, CA). The *IDUA* cDNA was inserted downstream to the Rous sarcoma virus (RSV) constitutive promoter. As in all Epstein-Barr virus (EBV)-based vectors, pREP9 presents EBV oriP (origin of replication), EBNA-1 gene (EBV nuclear antigen) and also the neomycin resistance (neo^R) gene. The resulting plasmid was named pRIDUA. *Escherichia coli* DH5 α -T1^R(Invitrogen Corp., San Diego, CA) was transformed with pRIDUA with a standard procedure [16] and the plasmid was purified using Qiagen Plasmid Maxi-Prep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

In vivo gene transfer

Two protocols of *in vivo* gene transfer were used. In the first one, complexes of Superfect/DNA were prepared essentially as previously described [17]. 50 µg of pRIDUA was complexed with 150 µg Superfect Reagent (Qiagen, Valencia, CA, EUA) and administered by intraperitoneal injection (ip) in mice. In the second protocol, mice received hydrodynamic intravenous injections (iv) [10], of 50 µg of pRIDUA in 2 ml saline solution via tail vein.

RT-PCR assay of IDUA mRNA expression in several tissues

Fourteen days after treatment, total RNA was harvested from liver, spleen, lungs and brain with Trizol reagent (Invitrogen, São Paulo, 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 at a concentration of approximately 10 µg/µl. Reverse transcription (RT) was performed using MMLV RNase H- reverse transcriptases (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) in appropriate conditions. In all reactions, cDNA was synthesized in 20 µl from 3 µl of total RNA. For each reaction, 4 µl RT (10X), 1 µl oligo (dT)²⁰ (500µM/ml), 2 µl dTT (0.1 M) and 1 µl dNTP (10 mM) , were used. Reactions were incubated at 70°C for 10 min, then 200 U RT enzymes was added and the reaction was incubated at 42°C for 90 min. The resulting cDNA was submitted to a PCR reaction with primers for the β-actin gene and the IDUA cDNA, resulting in amplified fragments of 300 bp and 198 bp in length respectively. The antisense IDUA primer was 5'CGCGGTGGGGTTGGAAGGAGT3' and the sense primer were 5'GTA GGTACGGACTGGCGCATG3'. The antisense primer for β-actin was

5'CGCTCATTGTAGAAGGTGTG3' and the sense primer was 5'GCTCGTCGTCGACAACGGCT3'. The samples were submitted to 35 cycles of PCR in a MJ Research Inc. thermal cycler (PTC-100). Samples were heated at 94°C for 5 min initially and for 1 min in each subsequent cycle to denature DNA. Primers were allowed to anneal at 58°C for 1min and the strand extension was carried out at 72°C for 1min with a final extension step of 7 min. The PCR was carried out in 25 µl reaction mixtures containing 3 µl total RNA, 0.2 mM each primer, 10 mM of each dNTP in *Taq* DNA polymerase buffer and 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). An aliquot (8 µl) of the PCR products was separated by electrophoresis in a 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

Analysis of enzyme level

About 30 mg of tissue was homogenized in water and the enzyme assay was performed as described by Clements et al. (1986) [18], using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide (Calbiochem, San Diego, CA, USA). After addition of 1.5 ml of 0.5 glycine-NaOH buffer, pH 10.3, fluorescence was measured with 365 nm (excitation) and 450 nm (emission) on Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi - F 2000. Results are expressed as ng/h/mg protein.

Analysis of glycosaminoglycans

Soluble glycosaminoglycans were extracted from 40 mg of tissue which by incubation in phosphate buffer 50 mM (pH 6.5) containing papain at 60°C overnight with shaking. Debris was removed by centrifugation. GAG quantification was

carried out in the supernatant according to Jong, 1992 [19]. The values obtained were expressed in μg GAGs/g of tissue.

Statistical analyses

Comparisons between groups were made by use of the ANOVA-Pos-Hoc Tukey test or the Kruscal Wallis test, where appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Six MPS I, IDUA-KO mice, divided in two groups of three, were injected with 50 µg of Superfect/pRIDUA complexes by intraperitoneal via (KO ip) and 50 µg of naked pRIDUA by hydrodynamic injection (KO iv) respectively. Two control groups of two mice each were utilized: one with normal mice and one with KO mice. Fourteen days after treatment blood was collected and the animals were killed by cervical dislocation. Organs collected included liver, spleen, kidney, lungs and brain, and the analyses included IDUA gene expression, enzyme activity and accumulation of GAGs.

RT-PCR analysis of gene expression

Amplification for the β -actin gene was observed in all organ samples from all animals in the study. When specific primers for IDUA cDNA were used, all the organ samples from control normal mice, as well as from treated animals, displayed a fragment with the expected size while the KO control group without treatment did not. The amplification standards obtained is shown in Fig. 1, which presents analyses of the spleen.

α -L-iduronidase activity

α -L-iduronidase activity was determined in tissue samples from all animals under study (Table 1). No activity was detected in any of the organs of the knockout control mice group, whereas high activity was seen in the normal group. The treated KO groups presented IDUA activity, but in low levels when compared

to the normal group. Although not statistically significant when compared to the KO control group, the analyses showed that IDUA activity was displayed in all organs of the mice receiving pall organs of the mice receiving pRIDUA. Administration of the vector by hydrodynamic injection resulted in higher IDUA activity in the spleen and brain when compared to the ip administration. In the blood, enzyme activity was detected in the normal control group but was absent in the others groups (not shown).

Accumulation of glycosaminoglycans

In this model, KO animals presented a statistically significant ($p < 0.05$) increase in GAGs when compared to normal mice. Table 2 shows the results of GAGs quantification in the organs analyzed in each group. The analyses of kidney and lungs did not show evidence of reduction in GAGs accumulation in any of the treated groups. In the spleen, liver and brain of mice receiving the IDUA gene by hydrodynamic or intraperitoneal injection the quantity of GAGs was reduced. However, the only sample group in which the decrease of GAG deposit was significantly lower ($p < 0,05$) than that of KO control mice was the spleen of iv-treated mice.

Discussion

This study showed for the first time the use of a nonviral gene delivery system, with plasmid vectors administered by hydrodynamic injection of naked pRIDUA or by intraperitoneal injection of pRIDUA/Superfect complexes, in a preclinical gene therapy protocol in a murine MPS I model. The results obtained in this work confirm the evidence that low levels of enzyme are sufficient to correct the accumulation of GAGs since even a small increase in enzyme activity, as presented by the spleen, caused a significant reduction in the accumulation of glycosaminoglycan. This has been shown in gene therapy protocols of several other metabolic diseases. Stein et al., 2001 [20] describe a preclinical protocol of gene therapy to MPS VII and hemophilia A murine model, using a feline immunodeficiency virus (FIV)-based lentiviral vectors encoding either human factor VIII or human β -glucuronidase, in the results obtained is able to be verified that low levels from the therapeutic enzyme were sufficient to reduce the symptoms of the diseases.

The pRIDUA, as any other naked DNA present in the circulation, is subject to degradation by the action of nucleases. The presence of the transgene in all treated organs can be explained, in the iv-treated group, by the great volume of the hydrodynamic injection, which causes a dilution of the nucleases. In the ip-treated mice, on the other hand, the presence of Superfect forming a complex with the DNA represents a protection against DNAses and facilitates the uptake of the plasmid in the target cells.

The vector employed in the present work was based on the Epstein Barr virus (EBV). We have previously shown the great efficiency of a similar system,

employing the plasmid pREP9 for the construction of a vector with the EGFP reporter gene, in the transfection of hematopoietic cells [17]. In that previous work transfection was done with the same cationic dendrimer (DNA/Superfect complex) presently used for the ip administration. However, the hydrodynamic administration of naked DNA seemed to be more efficient, as shown for instance by the increased IDUA activity and reduced GAG accumulation in the spleen. It has been reported that the hydrodynamic administration of plasmid DNA results in high level of transgene expression in the liver [21]. Other effects of the injection, reported in the same study, include a transient irregularity of heart function, sharp increase in venous pressure, enlargement of liver fenestrae and enhancement of membrane permeability of the hepatocytes. The high transfection rate has been attributed to the generation of membrane pores in the hepatocytes. This system has also proved very efficient for the transfer of the insulin gene to the liver of diabetic mice, resulting in high level of insulin expression [22].

Routine examinations carried out in MPS I children submitted to bone marrow transplantation showed that the first reversing effects of the clinical state appear in the spleen and in the liver [23]. In our experiments, it is possible that the period between the gene transfer experiments and the examination of animals was shorter than that necessary to allow the detection of reversal of GAG accumulation in the organs that presented enzyme activity. The RT-PCR analyses showed that all organs of the treated mice presented amplification of a fragment of the *IDUA* cDNA, indicating expression of the transgene. The absence of significant reversion of GAGs accumulation in the liver and brain, as well as the absence of enzyme activity in the liver and kidneys, support the suggestion of the need for a longer

period to observe these results. It is also possible that a larger number of mice in each group can show significant difference regarding reduction of GAGs and the presence of IDUA activity.

The results obtained in these experiments show that pRIDUA, administered by hydrodynamic injection, arises as a good vector alternative for gene transference protocols, particularly for lysosomal deposit and other metabolic diseases where low enzyme levels are sufficient for therapeutic activity. We believe that this work could be enriched with increasing analyses in different post-treatment periods and a higher sample number.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Katia Kvitko and Daniel Garcia dos Santos for identifying the IDUA-KO mice by PCR, Tiago Pereira for providing assistance with statistical analyses. This work was supported by FAPERGS, CAPES and CNPq.

References

- [1] U. Matte, G. Yogalingam, D. Brooks, S. Leistner, I. Schwartz, L. Lima, D. Y. Norato, J. M. Brum, C. Beesley, B. Winchester, R. Giugliani, J. J. Hopwood, Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol. Genet. Metab.* 78 (2003) 37-43.
- [2] A. Vellodi, E.P. Young, A. Cooper, J.E. Wraith, B. Winchester, C. Meaney, U. Ramaswami, A. Will, Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres, *Arch. Dis. Child.* 76 (1997) 92-99.
- [3] E.D. Kakkis, J. Muenzer, G.E. Tiller, L. Waber, J. Belmont, M. Passage, B. Izykowski, J. Phillips, R. Doroshov, I. Walot, R. Hoft, E.F. Neufeld, Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 182-188.
- [4] M.A. Baxter, R.F. Wynn, J.A. DEAKIN, I. BELLANTUONO, K.G. Edington, A. Cooper, G.T.N. Besley, H.J. Church, J.E. Wraith, T.F. Carr, L.J. Fairbairn, Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolisaccharidosis type I, *Blood* 99 (2002) 1857-1859.
- [5] Y. Zheng, N. Rozengurt, S. Ryazantsev, D.B. Kohn, N. Stake, E.F. Neufeld, Treatment of the mouse model of mucopolisaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow, *Mol. Genet. Metab.* 79 (2003) 233-244.
- [6] D.S. Anson, J. Bielicki, J.J. Hopwood, Correction of MPS type I fibroblasts by retroviral mediated gene transfer of the human α -L-iduronidase gene, *Hum. Gene Ther.* 3 (1992) 371-379.

[7] M.M. Huang, A. Wong, X. Yu, E. Kakkis, D.B. Kohn, Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts, *Gene Ther.* 4 (1997) 1150-1159.

[8] N.B. Nardi, L.A.K Teixeira, E.F.A. Silva, *Terapia Gênica, Ciência & Saúde Coletiva* 7 (2002) 109-116.

[9] H. Herweijer, J.A. Wolff, Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* 10 (2003) 453-458.

[10] F. Liu, Y.K. Song, D. Liu, Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA, *Gene Ther.* 6 (1999) 1258-1266.

[11] V. Marechal, A. Dehee, R.C. Brachet, T. Piolot, M.C. Moisan, J.C. Nicolas, Mapping EBNA-1 Domains Involved in Binding to Metaphase Chromosomes. *J. Virol.* (1999) 4385-4392.

[12] K.V. Craenenbroeck, P.Vanhoenacker, Haegeman, G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5665-5678.

[13] S.M. Stoll, C.R. Scimienti, E.J. Bana, L. Meuse, M.A. Kay, M.P. Calos, Epstein-Barr virus/human vector provides high-level, long-term expression of alpha 1-antitrypsin in mice, *Mol. Ther.* 4 (2001) 122-129.

[14] K. Ohmi, D.S. Greenberg, K.S. Rajavel, S. Ryazantsev, H.H. Li, E.F. Neufeld, Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1902-1907.

[15] D.G. Santos, N.B. Nardi; J.A.B. Chies, L.M.G.M. Braga; M. Camassola, K. Kvitko, *Caracterização de Camundongos Nocaute para Protocolo Pré-Clínico*

de Terapia Gênica de MPS I, In: XV Salão de Iniciação Científica 2003, Porto Alegre, RS, Brasil, p:520.

[16] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cols, 2nd. Spring Harbor Laboratory Press, new York, NY (1989).

[17] L.A.K. Teixeira, C.H. Fricke, C.B. Bonorino, M.R. Bogo, N.B. Nardi, Na efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors, *J. Biotech.* 88 (2001) 159-165.

[18] P.R. Clements, V. Muller, J.J. Hopwood, Human α -L-iduronidase gene. Catalytic properties, *Eur. J. Biochem.* 152 (1985) 29-34.

[19] J. G. N Jong, R. A . Wevers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.*, 38 (1992) 803-807.

[20] C.S. Stein, Y. kang, S.L. Sauter, K. Townsend, P. Staber, T.A. Derksen, I. Martins, J. Qian, B.L. Davidson, P.B. McCray, Jr., In Vivo Treatment of Hemophilia A and Mucopolysaccharidosis Type VII Using Nonprimate Lentiviral Vectors, *Mol. Ther.* 3 (2001) 850-856.

[21] S.F. ALIÑO, A. CRESPO, F. DASÍ, Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther.*, 10 (2003) 1672-1679.

[22] C.X. He, D. Shi, W.Ju. Wu, Y.F. Ding, D.M. Feng, B. Lu, H.M. Chen, J.H. Yao, Q. Shen, D.R. Lu, J.L. Xue, Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 567-572.

[23] C.B. Whitley, K.G. Belani, P.N. Chang, C.G. Summers, B.R. Blazar, M.Y. Tsai, R.E. Latchaw, N.K. Ramsay, J.H. Kersey, Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation, *Am. J. Med. Genet.* 46 (1993) 209-218.

Table 1. Determination of α -L-iduronidase activity in tissues. The results are expressed as ng/h/mg protein, and represent the average \pm standard deviation of groups of two (control) or three (experimental) animals.

| Group | Organ | | | | |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Spleen | Liver | Lungs | Kidney | Brain |
| KO ip | 0.052 \pm 0.065 | 0.058 \pm 0.001 | 0.049 \pm 0.068 | 0.023 \pm 0.002 | 0.015 \pm 0.006 |
| KO iv | 0.106 \pm 0.073 | 0.060 \pm 0.028 | 0.064* | 0.021 \pm 0.007 | 0.028 \pm 0.002 |
| KO | ND** | ND | ND | ND | ND |
| Normal | 77.50 \pm 7.78 | 48.50 \pm 0.71 | 46.00 \pm 2.83 | 26.00 \pm 1.41 | 29.00 \pm 12.73 |

* Result of only one of the samples, as the other two were not analyzed.

** Not detected.

Table 2. Determination of GAG accumulation in tissues. The results are expressed as $\mu\text{g GAG/g}$ of tissue, and represent the average \pm standard deviation of groups of two (control) or three (experimental) animals.

| Group | Organ | | | | |
|--------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Spleen | Liver | Lungs | Kidney | Brain |
| KO ip | 7735 \pm 825 | 8285 \pm 535 | 5762 \pm 816 | 7100 \pm 526 | 2110 \pm 340 |
| KO iv | 7348 \pm 452 | 7643 \pm 573 | 6870 \pm 733 | 7451 \pm 398 | 2316 \pm 183 |
| KO | 9480 \pm 148 | 9087 \pm 1594 | 6245 \pm 1689 | 7065 \pm 636 | 2797 \pm 625 |
| Normal | 380 \pm 312 | 284 \pm 39 | 651 \pm 301 | 295 \pm 26 | 368 \pm 14 |

Legend

Fig. 1. Electrophoresis standards of products amplified by RT-PCR of spleen tissue. 1, molecular size marker; 2, negative control; 3 and 4, RT-PCR of KO control sample using β -actin and *IDUA* specific primers respectively; 5 and 6, same as above for iv-treated animals; 7 and 8, same as above for ip-treated animals. β -actin-derived bands were 300 bp, and *IDUA* bands were 198 bp.

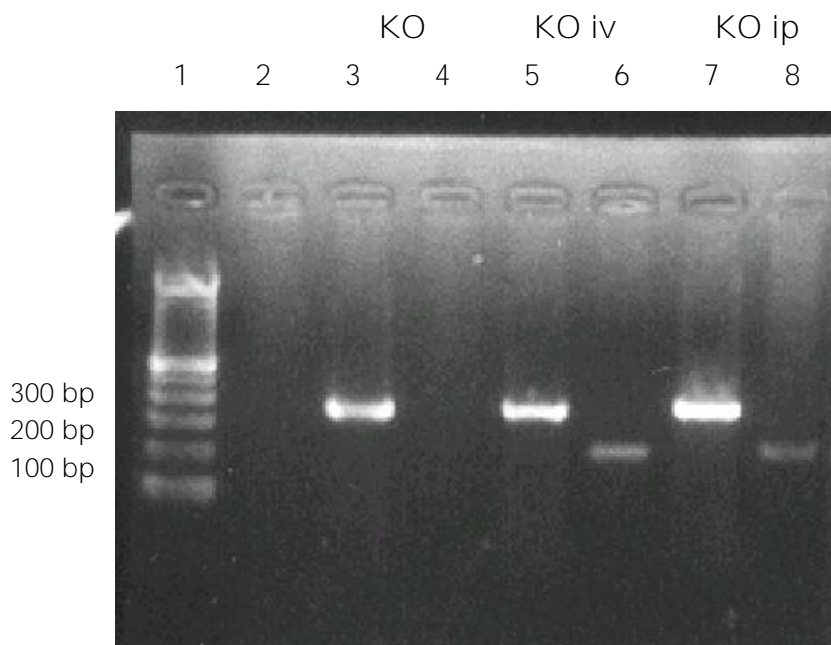


Figure 1

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentadas informações adicionais, referentes aos resultados obtidos com a construção do vetor não viral, ao experimento piloto inicialmente realizado e ao acompanhamento mais detalhado do acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) nos animais dos experimentos descritos no manuscrito que compõe o corpo principal desta dissertação. Estas informações contribuem para a discussão dos avanços obtidos com o trabalho como um todo. A metodologia utilizada é a mesma já descrita anteriormente.

Construção do pRIDUA

Os primeiros resultados obtidos neste trabalho foram na construção do vetor não viral pRIDUA. O fragmento contendo o cDNA IDUA foi obtido a partir da clivagem com *Bam*HI e *Hind*III do plasmídeo pH2.1 gentilmente cedido pela Dra. Elizabeth Neufeld (UCLA, Los Angeles, CA). Após a clivagem, o fragmento foi ligado no plasmídeo de expressão pREP9. A figura 1 mostra o mapa do pRIDUA. O tamanho final do plasmídeo resultante foi de 12,748 Kb.

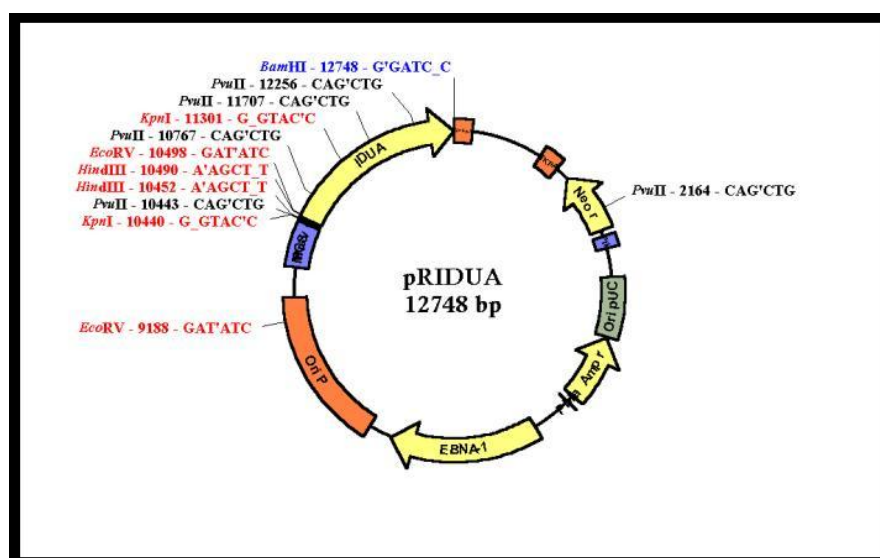


Figura 1 - Mapa de restrição do vetor plasmidial pRIDUA. Resultado da clonagem de um fragmento contendo o cDNA IDUA no plasmídeo de expressão pREP9.

Em seqüência, colônias de bactérias *Escherichia coli* foram transformadas com o produto desta ligação. As colônias foram selecionadas em meio contendo antibiótico e testadas quanto à presença do cDNA IDUA por reações de PCR (Figura 2). As colônias positivas foram crescidas em condições ideais e passaram por extração de DNA plasmidial. O DNA extraído foi clivado com diferentes enzimas de restrição (*PvuII*, *KpnI* e *EcoRV*) para a confirmar a ordem de clonagem do fragmento. A Figura 3A mostra o mapa de restrição esperado da clivagem, construído através do programa (pDRAW 32 1.0, <http://cellbiol.com/acacclone>). Os resultados obtidos com as clivagens realizadas estão expostos na Figura 3B. Depois da confirmação do plasmídeo, o mesmo foi produzido em grau

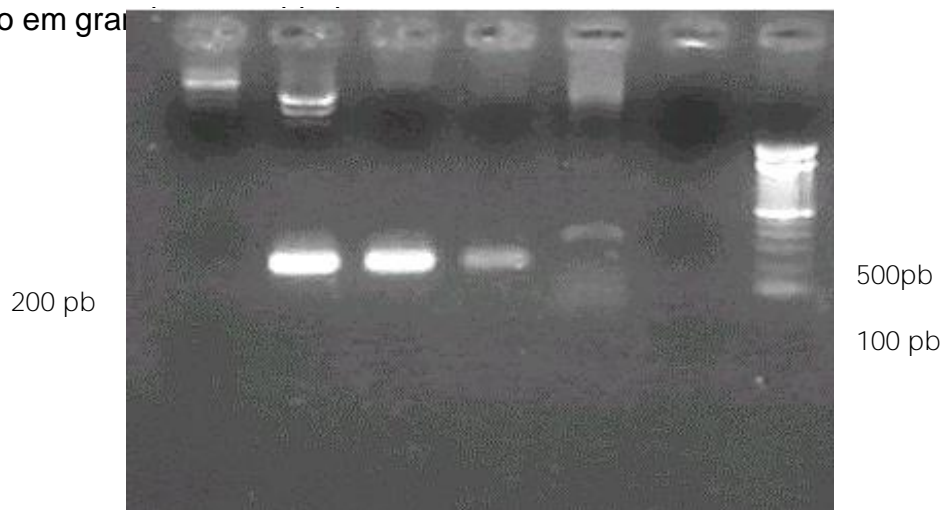


Figura 2 - Produto de PCR de colônia. 1) pREP9; 2) pH2.1; 3 e 4) pRIDUA (198 pb); 5) DNA genômico humano; 6) controle negativo da reação; 7) marcador de tamanho molecular (100 pb). Gel 2% de agarose corado com brometo de etídeo.

Experimento piloto de transferência gênica

Um experimento piloto foi realizado anteriormente ao trabalho proposto. Neste, quatro animais formaram o grupo experimental, onde três eram nocautes (KO) e um normal. Dentre os portadores de MPS I, um camundongo passou por tratamento com injeção hidrodinâmica contendo 50 µg de pRIDUA em solução salina (iv), outro passou por tratamento com injeção intraperitoneal com 50 µg de pRIDUA complexados com 100 µg de Superfect (ip) e um não foi tratado. Seis dias após o tratamento os camundongos foram mortos e o rim, baço, pulmão e

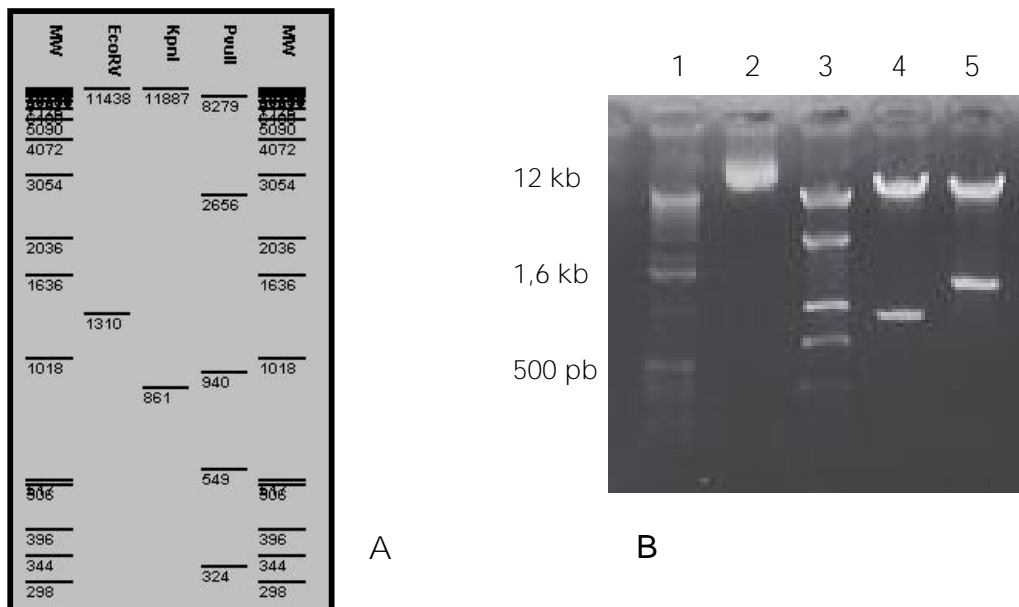


Figura 3 - Padrão de clivagem do pRIDUA usando as enzimas de restrição *PvuII*, *KpnII* e *EcoRV*. A - Padrão de clivagem esperado a partir do programa (pDRAW 32 1.0, <http://cellbiol.com/acacclone>). B - Padrão de clivagem do pRIDUA obtido e analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1) Marcador de tamanho molecular 1 kb; 2) pRIDUA não clivado; 3) pRIDUA clivado com *PvuII*; 4) pRIDUA clivado com *KpnI*; 5) pRIDUA clivado com *EcoRV*.

fígado foram coletados. Os órgãos passaram por análise da dosagem de glicosaminoglicanos e RT-PCR para avaliar a expressão do transgene. Durante este período, foram ainda coletadas amostras de urina destes animais em dias diferentes, para dosagem de GAGs. A atividade da IDUA também foi testada nos órgãos e no sangue destes animais depois dos seis dias de tratamento.

A análise da urina em pacientes suspeitos ou portadores de MPS foi, e continua sendo, um dos primeiros métodos empregados para diagnóstico da doença. Isto se deve ao fato de fragmentos de GAGs gerados por rotas alternativas serem excretados por esta via. Os testes de urina podem indicar qual o tipo de MPS do paciente, mas não indicam o subtipo da doença (Neufeld e col., 1995). Para acompanhar o tratamento deste grupo piloto, foram realizadas análises de GAGs presentes na urina em amostras coletados nos dias 1, 2 e 3 do tratamento. A Tabela 1 mostra alguns dos resultados obtidos, já que muitas das

amostras não tiveram a quantidade de GAGs determinada por falta de volume na hora da coleta. Nota-se um padrão de queda de GAGs em três dos animais quando observamos os dados obtidos.

A quantidade de GAGs acumulados foi avaliada nos órgãos extraídos. A Figura 4 representa as dosagens de glicosaminoglicanos resultantes. Os resultados indicam uma aparente diminuição de GAGs no baço e no fígado dos animais tratados iv e ip, se comparados com os animais KO que não passaram por nenhum tipo de tratamento. Também podemos observar que em todos os órgãos o acúmulo de GAGs mostrou-se bem menor nos animais normais.

Tabela 1 - Dosagens de GAGs nas amostras de urina coletadas em diferentes dias a partir do tratamento dos animais nocaute que receberam o pRIDUA por injeção ip (KO ip) ou iv (KO ip), nocaute não tratados (KO) e normais. Os resultados são expressos como μg GAG/g de tecido.

| Animal | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
|--------|-------|-------|-------|
| KO | 158 | 125 | 116 |
| KO ip | 139 | ND | 85 |
| KO iv | ND* | ND | 78 |
| Normal | 49 | 51 | 33 |

* Não determinado.

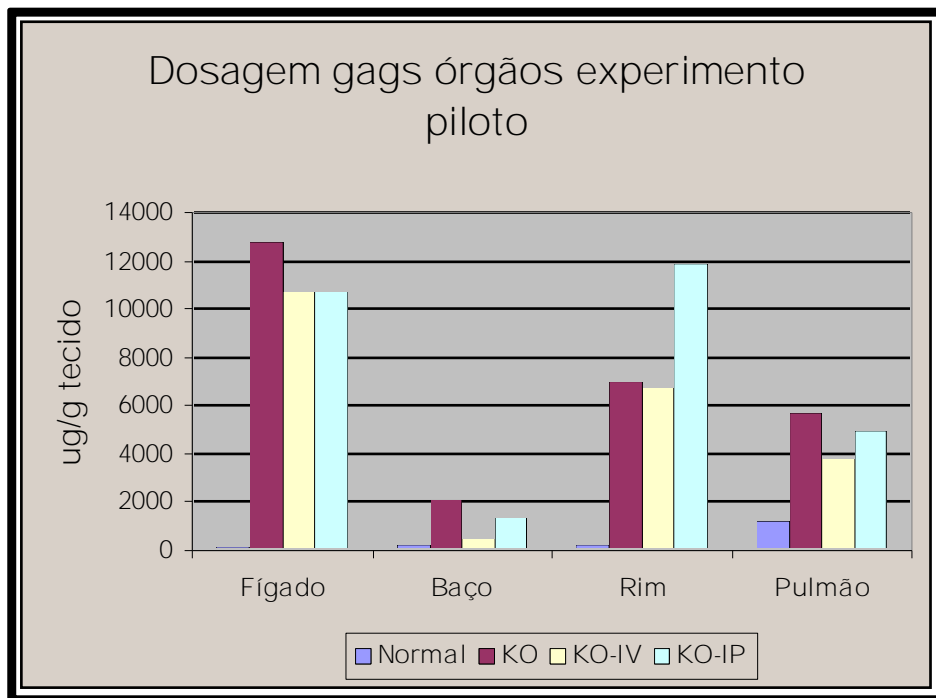


Figura 4 - Dosagens de glicosaminoglicanos do fígado, baço, rim e pulmão de animais KO, animais KO com tratamento iv e ip e animais normais.

Não foi verificada atividade enzimática da IDUA nos órgãos e sangue dos animais KO com ou sem tratamento no grupo piloto, ao contrário dos animais normais que apresentaram alta atividade nos órgãos e no sangue (dados não apresentados).

A partir de RNA total extraído dos órgãos foi sintetizado cDNA, submetido a PCR usando primers específicos para o cDNA IDUA e β -actina (Figura 5). Na RT-PCR obtivemos a amplificação do fragmento de β -actina em todos os órgãos e a amplificação do cDNA IDUA no baço e no rim dos animais com tratamento ip.

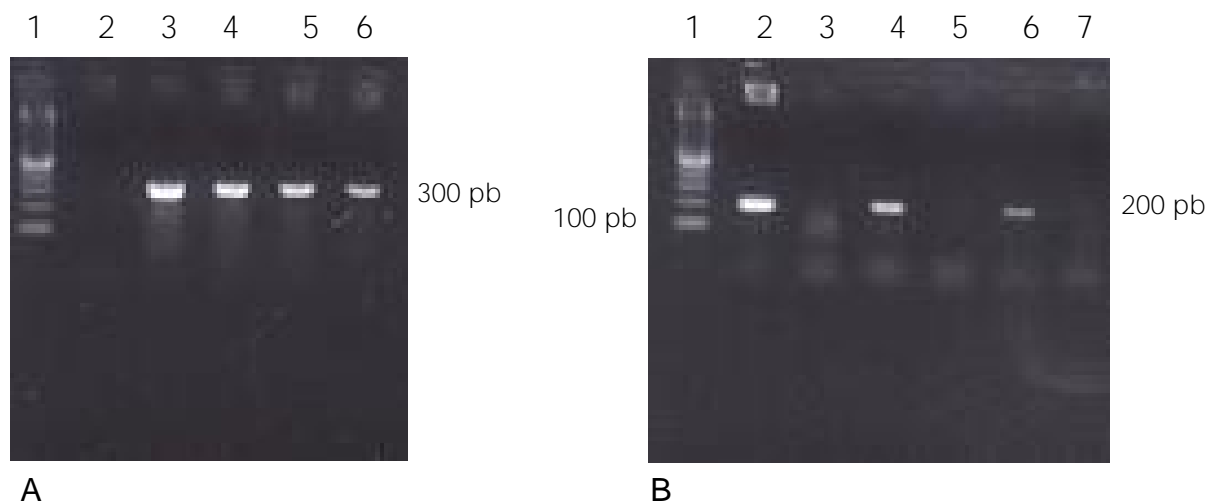


Figura 5 - Análise por RT-PCR dos órgãos extraídos depois de seis dias de tratamento, usando primers específicos para os genes da β -actina (A) e IDUA (B).
 A - 1) Marcador de tamanho molecular (100 pb); 2) controle negativo da reação; 3) baço de animal KO sem tratamento; 4) baço de animal KO tratado ip; 5) rim de animal KO sem tratamento; 6) rim de animal KO tratado ip.
 B - 1) Marcador de tamanho molecular (100 pb); 2) pRIDUA como controle positivo; 3 a 6) ídem à análise anterior; 7) controle negativo da reação .

Análises de GAGs na urina do grupo experimental: informações adicionais

Os seis grupos descritos anteriormente neste trabalho passaram por análises quanto à quantidade de GAGs na urina no dia 0 e nos dias 2, 4 e 6 após o tratamento. Na Tabela 2 são apresentados os dados obtidos, sendo que várias das amostras não foram analisadas devido ao baixo de urina coletada. Os resultados sugerem não ter havido diferença entre os animais normais e os animais KO e, além disso, a existência de oscilação nesta quantidade no mesmo animal.

Tabela 2 - Dosagens de GAGs nas amostras de urina coletadas em diferentes dias a partir do tratamento dos animais nocaute que receberam o pRIDUA por injeção ip (KO ip) ou iv (KO ip), nocaute não tratados (KO) e normais. Os resultados são expressos como μg GAG/g de tecido.

| Animal | Dia de tratamento | GAGs mg/mmol creatinina |
|------------|-------------------|-------------------------|
| 1. KO ip | 0 | ND* |
| | 2 | 64 |
| | 4 | 54 |
| | 6 | 36 |
| 2. KO ip | 0 | 144 |
| | 2 | 70 |
| | 4 | 69 |
| | 6 | ND |
| 3. KO ip | 0 | 132 |
| | 2 | 89 |
| | 4 | ND |
| | 6 | ND |
| 4. KO iv | 0 | 87 |
| | 2 | 137 |
| | 4 | 59 |
| | 6 | ND |
| 5. KO iv | 0 | 83 |
| | 2 | 68 |
| | 4 | 52 |
| | 6 | 109 |
| 6. KO iv | 0 | 45 |
| | 2 | 46 |
| | 4 | 49 |
| | 6 | 39 |
| 7. KO | 0 | 86 |
| | 2 | 85 |
| | 4 | 73 |
| | 6 | 54 |
| 8. KO | 0 | ND |
| | 2 | 59 |
| | 4 | 75 |
| | 6 | ND |
| 9. Normal | 0 | ND |
| | 2 | 39 |
| | 4 | 49 |
| | 6 | ND |
| 10. Normal | 0 | ND |

2
4
6

22
ND
ND

*ND: não determinado

DISCUSSÃO

Os genes carregados por seus vetores podem ser administrados de forma sistêmica ou local. Atualmente, vários estudos descrevem a injeção hidrodinâmica como um forma eficiente de transferência gênica sistêmica (Liu e cols., 1999; Herweijer e col., 2003; Aliño e cols., 2003). Um bom exemplo foi um trabalho realizado por He e cols. (2004), no qual a injeção hidrodinâmica foi utilizada como uma forma de administração de DNA nu em um protocolo pré-clínico para diabetes do tipo I. Tais trabalhos ressaltam que a injeção hidrodinâmica é segura, eficiente e conveniente, principalmente porque a eficiência do método não é alterada mesmo no caso do DNA nu. Embora, atualmente, o procedimento baseado na injeção hidrodinâmica seja inadequado para o uso clínico em humanos, tentativas de transferência local através de cateteres poderão ser realizadas.

Em administrações locais, o uso de compostos sintéticos catiônicos vem sendo uma outra boa alternativa (Tabata e cols., 2000; Harada e cols., 2000; Gharwan e cols., 2003). A administração intraperitoneal mostra-se eficiente quando o DNA usado está associado a algum complexo. Aoki e cols. (2001) mostraram em seu trabalho que a injeção intraperitoneal de plasmídeos complexados com lípideos catiônicos apresenta-se como perspectiva de transferência gênica devido a sua alta eficiência.

A partir destes estudos obtidos na literatura passamos a um teste piloto usando duas vias diferentes de administração. No teste piloto, observou-se uma diminuição no depósito de GAGs no fígado e baço dos animais KO tratados ip e iv, quando comparados com o animal KO sem tratamento. Estes dados, relacionados com a falta da atividade de IDUA em todos os órgãos analisados e a amplificação por RT-PCR do cDNA *IDUA* no baço e no rim de animais tratados ip, podem indicar a presença da enzima em baixos níveis a ponto da mesma não poder ser detectada.

Ainda neste experimento piloto, em análises realizadas após seis dias de tratamento, foi observada a expressão do transgene apenas com tratamento ip; já no experimento usando seis grupos de animais, onde as análises foram realizadas após quatorze dias de tratamento, a expressão foi detectada em todos os órgãos dos animais tratados.

O fato de em sete dias ter aparecido a expressão do transgene pode estar relacionada a presença do Superfect, já que este além de proteger o DNA da degradação enzimática facilita a sua entrada nas células.

O resultado observado, de que mesmo níveis baixos da atividade enzimática podem causar diminuição nos depósitos de GAGs, vêm ao encontro de estudos realizados para MPS I e outras doenças genéticas. Para MPS I este fato é explicado através do processamento pós-traducional que acontece com a IDUA, onde ocorre a adição de resíduos 6-manose-fosfato na molécula protéica, fazendo com que ela seja endocitada através de receptores, conseqüentemente, mesmo as células que não estão expressando o transgene recebem a proteína *in trans* (Di Natale e cols., 2002; Zheng e cols., 2003).

Os principais pontos a serem discutidos a partir dos resultados do trabalho usando seis grupos diferentes de animais já se encontram no conjunto do manuscrito. Atualmente, a identificação e quantificação de GAGs é um dos primeiros testes aplicados aos pacientes suspeitos de portarem MPS. Na urina são encontrados fragmentos de glicosaminoglicanos resultantes de degradação parcial. Para acompanhar a eficiência da transferência gênica, bem como a expressão do transgene, esta análise foi feita tanto no teste piloto como nos grupos experimentais descritos no manuscrito. As quantidades de GAGs presentes na urina mostraram-se bastante semelhantes entre todos os grupos de animais, inclusive quando a comparação foi feita entre os grupos de animais normais e os grupos de animais KO sem nenhum tipo de tratamento. Conseqüentemente, a dosagem de GAGs na urina deste modelo animal não apresentou-se adequada para diferenciar camundongos C57Bl/6 normais de um modelo KO para MPS I. Similarmente, Li e cols. (1999) ao descreverem um modelo murino para síndrome de Sanfilippo puderam observar que não existiam diferenças significativas na quantidade de GAGs na urina de animais normais e o modelo.

A coleta de urina, feita sem a ajuda de uma gaiola metabólica, não atingiu, em muitos casos, o volume necessário (aproximadamente 40 µl) para realização das análises. Este fato acabou acarretando falta de informações que seriam importantes para a conclusão final deste trabalho. Além disso, a oscilação

presente na quantificação realizada no mesmo animal pode estar ocorrendo devido a excreção diferencial durante o dia, o que também seria resolvido com o uso de gaiolas metabólicas. O uso deste procedimento nos levaria a mimetizar a rotina de coleta da urina dos pacientes de MPS, feita a partir de um homogeneizado colhido durante 24 horas, justamente porque a excreção de GAGs é diferente durante as horas do dia.

Um estudo com humanos realizado por Albano e cols. (2000) descreve 19 casos de pacientes portadores de MPS, avaliando características fenóticas dos pacientes como a mensuração da concentração de GAGs na urina, discriminando as proporções de dermatan sulfato, heparan sulfato, condroitin sulfato e queratan sulfato, para diagnosticar tipos diferentes de MPS. Nem todos os pacientes apresentaram níveis aumentados de GAGs na urina, indicando que nem sempre os níveis de GAGs na urina estão relacionados com a doença. Para confirmação dos diagnósticos foram realizados testes enzimáticos. O conjunto destes dados aponta a necessidade de uma possível alteração nos testes diagnósticos atualmente realizados quando há suspeita de mucopolissacaridose.

Em conclusão, este trabalho introduz uma interessante alternativa ao uso de vetores virais para a terapia gênica da mucopolissacaridose I, estudada em um modelo murino. As perspectivas de sua continuidade incluem o teste de outras vias de administração de vetores plasmidiais, incluindo o tratamento ex vivo com células tronco mesenquimais, bem como a construção de outros tipos de vetores com o gene IDUA, a serem testados neste mesmo modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- ALBANO, L. M. J.; SUGAYAMA, S. S. M. M; BERTOLA, D. R.; ANDRADE. C. E. F.; UTAGAWA, C. Y.; PUPPI, F.; NADER. H. B.; TOMA, L.; COELHO, J.; LEISTNER, S.; BURIN, M.; GIUGLIANI, R.; KIM, C. A. 2000. Clinical And Laboratorial Study Of 19cases Of Mucopolysaccharidoses. Revista do Hospital Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. 55 : 213-218.
- ALIÑO, S.F.; CRESPO, A.; DASÍ, F. (2003) Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. Gene Therapy, 10: 1672-1679.
- ANSON, D.S.; BIELICKI, J.; HOPWOOD, J.J. (1992) Correction of MPS type I fibroblasts by retroviral mediated gene transfer of the human α -L-iduronidase gene. Human Gene Therapy, 3: 371-379
- AOKI K.; FURUHATA S.; HATANAKA K.; MAEDA M.; REMY J.S.; BEHR J.P.; TERADA M.; YOSHIDA T. 2001. Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. Gene Therapy. 8: 508-514.
- BAXTER, M.A.; WYNN, R.F.; DEAKIN, J.A.; BELLANTUONO, I.; EDINGTON, K.G.; COOPER, A.; BESLEY, G.T.N; CHURCH, H.J.; WRAITH, JE.; CARR, T.F.; FAIRBAIM, L.J. 2002. Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolisaccharidosis type I. Blood. 99(5): 1857-1859.
- CAVAZZANA-CALVO, M; HACEIN-BEY, S; BASILE, GS; GROSS, F; YVON, E; NAUSBAUM, P; SELZ, F; HUE, C; CERTAIN, S; CASANOVA, JL; BOUSSO, P; DEIST, F; FISCHER, A. 2000. Gene Therapy of Human Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. Science, 288:669-672.

- CRAENENBROECK, K.V.; VANHOENACKER, P.; HAEGEMAN, G. 2000. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *European Journal Biochemistry*. 267: 5665-5678.
- CONNELLY, S. . Adenoviral Vectors. In: MEAGER, A., eds.: *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations. From Laboratory to Clinic*. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1999, 87-107.
- DI NATALE, P; DI DOMENICO, C; VILLANI, GR; LOMBARDO, A; FOLLENZI, A; NALDINI, L. 2002. In Vitro Gene Therapy of Mucopolysaccharidosis Type I by Lentiviral Vectors. *European Journal of Biochemistry*. 269: 2764-2771.
- GEHL, J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177: 437-447.
- GHARWAN, H.; WIGHTMAN, L.; KIRCHEIS, R.; WAGNER, E.; ZATLOUKAL, K. 2003. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA). *Gene Therapy*. 10: 810-817.
- HARADA, Y.; TABATA, M.; SATOH, E.; IWAI, M.; IAMANISHI, J.; MAZDA, O. 2000. Superfect Reagent-mediated transfection with an EBV-based plasmid vector. *Qiagen News*. 5: 12-14.
- HE C.X.; SHI D.; WU W.J.; DING Y.F.; FENG D.M.; LU B.; CHEN H.M.; YAO J.H.; SHEN Q.; LU D.R.; XUE J.L. 2004. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration, *World Journal Gastroenterology* 10: 567-572.
- HERWEIJER, H.; WOLFF, J.A. 2003. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy*. 10: 453-458.

- HUANG, M.M.; WONG, A.; YU, X.; KAKKIS, E.; KOHN, D.B. (1997) Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. *Gene Therapy*, 4:1150-1159.
- KAKKIS, E.D.; MUENZER, J.; TILLER, G.E.; WABER, L.; BELMONT, J.; PASSAGE, M.; IZYKOWSKI, B.; PHILLIPS, J.; DOROSHOW, R.; WALOT, I.; HOFT, R.; NEUFELD, E.F. 2001. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I, *New England Journal of Medicine*, 344:182-188.
- KIM, C.K.; HAIDER, K.H., LIM, S.J. 2001. Gene Medicine: A New Field of Molecular Medicine. *Archival Pharmacological Research*, 24: 1-15.
- LI, H.H.; YU, W.H.; ROZENGURT, N.; ZHAO, H.Z.; LYONS, K.M.; ANAGNOSTARAS S.; FANSELOW, M.S.; SUZUKI, K.; VANIER, M.T.; NEUFELD, E.F. 1999. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding α -N-acetylglucosaminidase. *Proceedures of Natural Academic Science USA*. 96: 14505-14510.
- LIU, F; SONG, YK; LIU, D. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*. 6: 1258-1266.
- MARECHAL, V.; DEHEE, A.; BRACHET, R.C.; PIOLOT, T.; MOISAN, M.C.; NICOLAS, J.C. 1999. Mapping EBNA-1 Domains Involved in Binding to Metaphase Chromosomes. *Journal of Virology*. 4385-4392.
- NARDI, N.B.; TEIXEIRA, L.A.K., SILVA, E.F.Á. 2002. Terapia Gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7: 109-116.
- NEUFELD, E.F.; MUENZER, J. (1995) The mucopolysaccharidoses, in: C.R.Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, seventh ed., McGraw-Hill, New York.

- POUTON, C.W.; SEYMOUR, L.W. 1998. Key issues in non-viral gene delivery. *Advanced drug Delivery Reviews*. 34: 3-19.
- ROBBINS, P.D.; CHIVIZZANI, S.C. 1998 Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacological Therapy*. 80 (1): 35-47.
- SMITH, K.R. 2003 Gene Therapy: Theoretical and Bioethical Concepts. *Archives of Medical Research*. 34: 247-268.
- SNYDER, R.O .; FLOTTE, T.R. 2002. Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 418-423.
- STOLL, S.M.; SCLIMENTI, C.R.; BANA, E.J.; MEUSE, L.; KAY, M.A.; CALOS, M.P. 2001. Epstein-Barr virus/human vector provides high-level, long-term expression of alpha 1-antitrypsin in mice. *Molecular Therapy*. 4: 122-129.
- TABATA, H.M.; HARADA, Y.; MATSUMURA, T.; SATOH, E.; CUI, F.; IWAI, M.; KITA, M.; HIBI, S.; IMANISHI, J.; SAWADA, Y.; MAZDA, O. 2000. Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine. *Gene Therapy*, 7: 53-60.
- VELLODI, A; YOUNG, EP; COOPER, A; WRAITH, JE; WINCHESTER,B; MEANEY, C; RAMASWAMI, U; WILL, A. 1997. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Archives of Disease Childhood*, 76(2): 92-99.
- ZHENG, Y.; ROZENGURT, N.; RYAZANTSEV, S.; KOHN, D.B.; STAKE, N.; NEUFELD, E.F. 2003. Treatment of the mouse model of

mucopolisaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Molecular Genetics and Metabolism*, 79:233-244.