

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

**CORREÇÃO *IN VITRO* DA DEFICIÊNCIA DE ARILSULFATASE A
EM FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA
ATRAVÉS DO USO DE CÉLULAS RECOMBINANTES MICROENCAPSULADAS**

Valeska Lizzi Lagranha

*Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Genética e Biologia
Molecular da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre.*

**Orientador: Dr. Roberto Giugliani
Co-Orientadora: Dra. Ursula da Silveira Matte**

Porto Alegre, março de 2008.

Este trabalho foi realizado no Centro de Terapia Gênica, localizado no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS), com recursos do CNPq, Rede de Terapia Gênica-Institutos do Milênio, MCT, FIPE-HCPA e ONG Pela Vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Giugliani, por ter aceitado me orientar, pelas oportunidades oferecidas, pela amizade, atenção, e principalmente por ter confiado no meu trabalho.

À Dra Ursula Matte, pela amizade, confiança, discussões científicas (até mesmo via skype) e também pelas idéias e sugestões brilhantes! Obrigada pela atenção, principalmente nos últimos dias! E claro, agradeço também à Sofia, que se mostrou paciente, colaborando para que as últimas etapas deste trabalho pudessem ser concluídas.

A todos os colegas do Centro de Terapia Gênica (CTG) pela conversas, companheirismo, brincadeiras, “rodas de chimarrão”, e principalmente pela amizade e carinho que acabou fazendo de todos vocês a minha família aqui.

Aos colegas Álvaro e Rafael, do Laboratório de Hepatologia, pela amizade e também pelos “cafezinhos”.

À Talita Giacomet, vulgo Tico (ou será Teco?), pelo auxílio nas etapas laboratoriais no projeto.

À Bruna Cardoso pela ajuda inicial com os ensaios enzimáticos. E a Patrícia Lopes por me ensinar a trabalhar com cultura celular.

Aos meus amigos, Magali, Disney e Roni, que mesmo distantes, sempre se fizeram presentes.

Ao Dr. Ferreira pelo seu carinho, apoio, ajuda, e por me receber em Porto Alegre, no início do meu mestrado.

Aos professores do PPGBM Pelos conhecimentos repassados durante este período.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela infra-estrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho. Principalmente aos laboratórios do Centro de Pesquisas e ao Serviço de Genética Médica.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado. E à Rede de Terapia Gênica/Institutos do Milênio pelo financiamento deste projeto.

Ao Elmo e à Ellen, por estarem sempre dispostos a ajudar, muitas vezes por bate-papo via “gmail”.

E finalmente à toda minha família, pelo amor, amizade, apoio incondicional, e principalmente por compreenderem minhas ausências por muitas vezes. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	12
1.2. Doenças Lisossômicas.....	13
1.2.1 Leucodistrofia Metacromática.....	14
1.2.2. Diagnóstico.....	23
1.2.3. Tratamento	25
1.3. Células Encapsuladas.....	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. ARTIGO.....	32
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS	72
7. ANEXOS	84
7.1 PROTOCOLOS LABORATORIAIS	84
7.1.1 Clonagem Molecular	84
7.1.2 Cultura Celular	91
7.1.3 Transferência Gênica	94
7.1.4 Ensaio Enzimático	97
7.2 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AOS RESULTADOS	104
7.2.1 Clonagem Molecular	105
7.2.2. Encapsulação Celular.....	109
7.2.3 Reversão da deficiência de ARSA nos fibroblastos tratados.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das formas clínicas encontradas na LDM	15
Tabela 2. Principais associações entre genótipo e fenótipo em LDM e PD-ARSA	21
Tabela 3. Relação entre fenótipos bioquímicos sugestivos de LDM e possíveis diagnósticos...	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos EIM de acordo com Saudubray e Charpentier	12
Figura 2. Rota de degradação de cerebrosídeo sulfato).....	19
Figura 3. Sessão transversal esquemática do mecanismo de encapsulação celular.....	29
Figura 4. Tráfego de enzimas lisossômicas e correção cruzada.	66
Figura 5. Mapa do plasmídeo pBEH HT14/CP8.....	105
Figura 6. Digestão do plasmídeo pBEH HT14/CP8 com a enzima <i>EcoRI</i>	106
Figura 7. Mapa do vetor de expressão pTRACER-CMV2).	106
Figura 8. Extração de DNA com fenol-clorofórmio para tragem de clones recombinantes. ..	107
Figura 9. Amplificação do gene <i>ARSA</i> nos de clones transformados.....	107
Figura 10. Digestão do plasmídeo pTARSA-CMV2 com as enzimas <i>Clal</i> e <i>KpnI</i>	108
Figura 11. Desenho esquemático do vetor pTARSA-CMV2	109
Figura 12. Metodologia da Encapsulação	110
Figura 13. Software ImagePró-Plus usado para medir o tamanho das cápsulas.....	111
Figura 14. Células encapsuladas.	112

LISTA DE ABREVIATURAS

4-UM: 4-metilumbiliferil

5'-AZA: 5'-aza-2'-deoxicitidina

A: adenina

ARSA: arilsulfatase A

ASB: arilsulfatase B

BHE: barreira hematoencefálica

BHK: *baby hamster kidney*

BMP: *basic myelin protein*

C: citosina

cDNA: DNA complementar

CHO-K1: *chinese hamster ovary- clone K1*

CIAP: *calf intestinal alkaline phosphatase*

CMV: citomegalovírus

CNTF: *ciliary neurotrophic factor* DL: doenças lisossômicas

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EIM: erros Inatos do Metabolismo

FCM: fator de calibração médio

FCP: fator de calibração parcial

G: guanina

GABA: ácido alfa-aminoglutárico

GAGs: glicosaminoglicanos

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*

GFP: *green fluorescence protein*

GUSB: beta-glucuronidase

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HepG2: linhagem celular de hepatocarcinoma humano

HIV: vírus da imunodeficiência humana

Kb: quilobase

KDa: quilodalton

LAM-PCR: *linear amplification-mediated PCR*

LB: meio de cultivo de Luria-Bertani

LDM: leucodistrofia metacromática

M6P: resíduo de manose-6-fosfato

M6PR: receptor de manose-6-fosfato

MAP2: *microtubule associated protein 2*

MPS: Mucopolissacaridose

mRNA: RNA mensageiro

N: asparagina

NB: neuroblastomas

NCS: 4-nitrocatecol sulfato

OL: oligodendrócitos

P/S: *penicillin/streptomycin*

PAPS: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato

pb: pares de bases

PBS: *phosphate buffer saline*

PCR: *polymerase chain reaction*

PD-ARSA: pseudodeficiência de arilsulfatase A

PEI: Polietilenoimino

PES: poliéter-sulfona

pH: potencial Hidrogeniônico

PSAP: *prosaposin*

QM: Quociente médio

qPCR: PCR quantitativo

rBHK: BHK recombinante

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

SUMF-1: sulfatase modifying factor 1

T: timina

TACTH: transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

TE: Tampão de eluição

TG: terapia gênica

TRE: terapia de reposição enzimática

UV: ultra-violeta

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

β -gal: beta-galactosidase

RESUMO

Leucodistrofia metacromática (LDM) é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima arilsulfatase A (ARSA) que afeta primariamente o sistema nervoso central (SNC). Tratamentos em estudos incluem a terapia de reposição enzimática e o transplante de medula óssea, porém com limitações devido à barreira hemato-encefálica (BHE). Uma alternativa seria a implantação no cérebro de células encapsuladas superexpressando ARSA, simulando a reposição enzimática sem injeções repetidas e eliminando a necessidade de transpor a BHE. Baseado nisto, testamos a habilidade de células BHK encapsuladas superexpressando ARSA em corrigir a deficiência enzimática em fibroblastos de pacientes com LDM. Três grupos foram analisados: fibroblastos tratados com células BHK superexpressando ARSA (rBHK) imobilizadas em cápsulas de alginato (grupo *CAPSULES*), fibroblastos tratados com o sobrenadante de células rBHK não encapsuladas (grupo *UPTAKE CONTROL*) e fibroblastos tratados com as cápsulas vazias (grupo *EMPTY*). Fibroblastos não tratados e normais foram usados como controles. As rBHK foram obtidas por seleção clonal após transfecção com o vetor pTARSA-CMV2, por método de transferência gênica não viral. A atividade de ARSA foi medida após 1, 2, 3 e 4 semanas de tratamento, usando ensaio espectrofotométrico. A atividade de beta-gal foi usada como referência. A análise estatística foi realizada usando os testes ANOVA e Tukey post hoc. Fibroblastos normais têm uma atividade de ARSA de 23,9 +/- 2,01 nmol/h/mg prot. Fibroblastos não tratados apresentaram baixos níveis enzimáticos (2,22 +/- 0,17). O grupo *EMPTY* apresentou os mesmos níveis de ARSA que os fibroblastos não tratados. Os grupos *CAPSULES* e *UPTAKE CONTROL* demonstraram altos níveis de ARSA, respectivamente 23,42 +/- 6,39 e 42,35 +/- 5,20 ($p < 0,01$ para todos os grupos), quando comparado aos fibroblastos não tratados. Clones de rBHK encapsulados demonstraram um alto potencial como nova estratégia terapêutica no tratamento de LDM, alcançando níveis enzimáticos normais em fibroblastos humanos deficientes. Entretanto, mais estudos devem ser realizados usando modelo animal para corroborar nossos achados.

ABSTRACT

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessive disorder due to arylsulfatase A (ARSA) deficiency that affects primarily the Central Nervous Systems (CNS). Ongoing treatments include enzyme replacement therapy and bone marrow transplantation, both limited in their effects due to the blood-brain barrier. An alternative would be the implantation in the brain of encapsulated cells over expressing ARSA that would eliminate the need of repeated infusions and overcome the blood brain barrier. Based on that, we tested the ability of encapsulated BHK cells over expressing ARSA to correct enzymatic deficiency in fibroblasts from MLD patients. Three groups were analyzed: fibroblasts treated with ARSA-over expressing BHK cells (rBHK) trapped in alginate capsules (*CAPSULES* group), fibroblasts treated with supernatant of non-encapsulated rBHK (*UPTAKE CONTROL*) and fibroblasts treated with empty capsules (*EMPTY* group). Untreated and normal fibroblasts were used as controls. rBHK were obtained by clone selection after non viral transfection with pTARSA-CMV2. ARSA activity was measured after 1, 2, 3 and 4 weeks of treatment using spectrophotometric assay, and beta-gal was used as reference enzyme. Sattistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's test. Normal group showed an ARSA activity of 23.9 ± 2.01 nmol/h/mg prot. MLD untrated had the lowest ARSA activity (2.22 ± 0.17). *EMPTY* group ARSA activity was equal untreated fibroblasts (2.71 ± 0.34). *CAPSULES* and *UPTAKE CONTROL* groups showed higher enzymatic levels, compared with to the MLD untreated, respectively 23.42 ± 6.39 and 42.35 ± 5.20 ($p < 0,01$ for all groups). Encapsulated rBHK clones show potencial as a new therapeutic strategy for the treatment of MLD, reaching a normal enzyme levels in human MLD fibroblasts. However more studies are still needed using MLD animal model to corroborate our findings.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que geralmente correspondem a uma deficiência enzimática capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica (Sainz *et al.*, 2002; Araújo, 2004). Ocasionalmente, portanto, defeitos que envolvem processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas do organismo (Giugliani *et al.*, 1999).

Cerca de 500 EIMs diferentes foram identificados até o momento, correspondendo a cerca de 10% de todas as doenças genéticas (Gimenez-Sanches *et al.*, 2001). Apesar de individualmente raros, os EIMs são freqüentes em conjunto, apresentando uma incidência estimada em aproximadamente 1/5000 nascidos vivos (Souza, 2002; Martins, 2003).

Tratando-se de alterações metabólicas bastante distintas, os EIMs possuem diversas classificações. A classificação estabelecida por Saudubray e Charpentier (1995), apresentada na figura esquemática abaixo, é a de maior aplicação clínica.

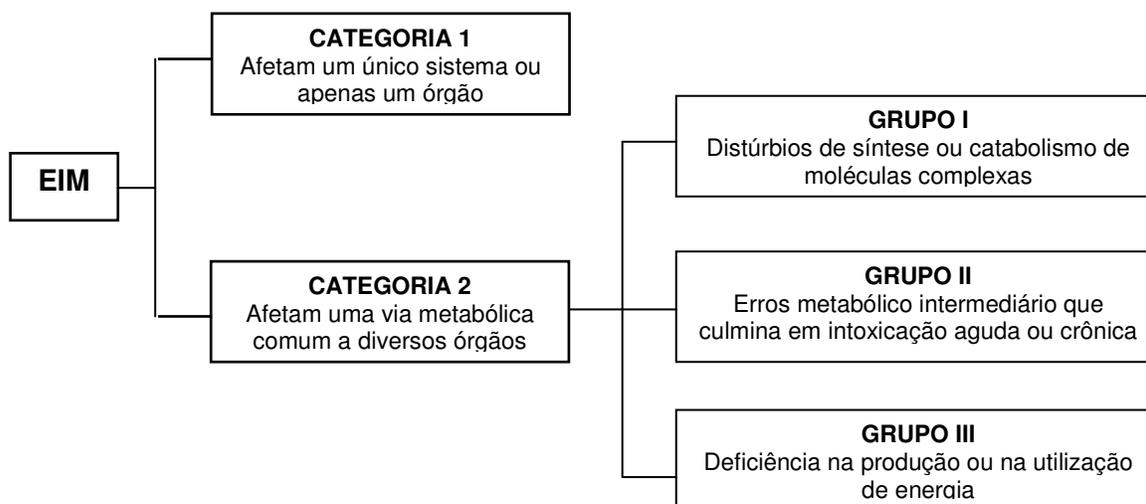


Figura 1. Classificação dos EIM de acordo com Saudubray e Charpentier (1995).

Os distúrbios do grupo I compreendem as doenças lisossômicas, como as mucopolissacaridoses, esfingolipidoses e as doenças peroxissomiais (Martins, 2003).

Esse grupo apresenta sintomas permanentes que tendem a acentuar com o passar do tempo, como *facies* grosseira, dismorfias, visceromegalias, neurodegeneração, entre outros, de acordo com a localização do acúmulo.

1.2. Doenças Lisossômicas

As doenças que hoje conhecemos como doenças lisossômicas (DL) foram descobertas entre o século XIX e XX, muito antes da descoberta do lisossomo em 1955 por de Duve. Quando as estruturas e funções das organelas celulares foram definidas e diferentes enzimas foram identificadas, o conceito de DL evoluiu (Wilcox, 2004). Cada enzima lisossômica faz parte de um complexo sistema que transforma macromoléculas em pequenos componentes que serão reutilizados pelas células ou eventualmente eliminados do organismo. Os lisossomos contêm inúmeras hidrolases ácidas que catalisam proteínas, lipídeos, sulfatos, fosfatos, ácidos nucleicos, e carboidratos (Wraith, 2002; Wilcox, 2004).

Uma deficiência enzimática causa um bloqueio nesse processo catabólico, levando ao contínuo acúmulo do metabólito intermediário. Com o acúmulo destes produtos, o lisossomo aumenta e acaba por ocupar cada vez mais o espaço intracelular interferindo assim na função celular (Wilcox, 2004).

Atualmente em torno de 50 diferentes DLs são conhecidas em humanos e, em sua maior parte, são doenças autossômicas recessivas (Wilcox, 2004). Para muitas destas enfermidades os cuidados paliativos são os únicos que podem ser oferecidos. No entanto, significativos avanços têm ocorrido no tratamento desse grupo de doenças. Esses incluem o transplante de medula óssea, a terapia de reposição enzimática e a depleção do substrato (Wraith, 2002).

O diagnóstico das DLs pode começar por testes simples que auxiliam no processo de investigação (pesquisa de metabólitos acumulados) e prosseguir com testes específicos para um diagnóstico definitivo (ensaios enzimáticos ou moleculares). O diagnóstico bioquímico de certeza das DL se dá pela medida da atividade enzimática, que pode ser realizada em amostras de plasma, leucócitos e/ou cultura de células (Wilcox, 2004), sendo que a escolha do material adequado depende das peculiaridades de cada caso.

As DLs podem ser classificadas tanto pelo tipo de material acumulado, quanto pela proteína deficiente. Dentre as doenças lisossômicas que ocorrem devido a uma deficiência na degradação dos esfingolipídios, podemos citar a doença de Fabry, Gaucher, Gangliosidoses GM1, Krabbe e Leucodistrofia Metacromática.

1.2.1 Leucodistrofia Metacromática

A leucodistrofia metacromática (LDM) é um EIM de herança autossômica recessiva, causada pela deficiência congênita da enzima arilsulfatase A (ARSA; EC 3.1.6.8), também denominada de cerebrosídeo sulfato sulfatase. Esta é uma enzima lisossômica envolvida na degradação de diversos esfingolipídios sulfatados, sendo o cerebrosídeo sulfato o mais importante deles (Mabe-Santana, 2006; Kurai *et al.*, 2007b). A deficiência desta enzima leva ao acúmulo de um esfingolipídio que é de grande importância na composição da mielina. Sua síntese ocorre principalmente nos oligodendrócitos e células de Schwann a partir da sulfatação do galactosilcerebrosídeo (Mabe-Santana, 2006).

A LDM vem sendo diagnosticada com uma frequência global estimada em 1: 40.000 recém nascidos vivos (Hess *et al.*, 1996; Sevin *et al.*, 2007). Contudo, a incidência relatada por diversos autores oscila entre 1: 40.000, como no norte da Suécia e 1: 170.000 na Alemanha. Uma frequência alta, de 1 em 2.520 recém nascidos vivos, foi descrita entre os índios navajos do sudoeste norte americano (Mabe-Santana, 2006).

1.2.1.1. Patologia Molecular

A patologia da LDM é caracterizada primariamente por desmielinização e por depósito de grânulos metacromáticos no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). Estes depósitos têm um diâmetro de 15 a 20 µm e secções de tecidos congeladas exibem coloração marrom quando coradas com 1% de solução acidificada de violeta cresil (von Figura *et al.*, 2001).

Microscopia eletrônica de alta resolução dos grânulos depositados mostra que as inclusões são rodeadas pela membrana, mostrando sua natureza

lisossômica. A morfologia das inclusões varia, mas duas formas são as mais características: prismática e lamelar (von Figura *et al.*, 2001).

A desmielinização no tronco cerebral e cordão espinhal são proeminentes na forma infantil de LDM. Ocorre também no SNP, com grânulos metacromáticos presentes nas células de Schwann e em macrófagos endoneuriais. As células da retina também acumulam grânulos metacromáticos com uma ultra-estrutura laminar (Sevin *et al.*, 2007). Órgãos viscerais também podem acumular sulfatídeos. Tecidos com função excretora são particularmente afetados. Nos rins, o material metacromático está mais presente nas células da alça de Henle, túbulos contorcidos distais, túbulos coletores, lúmen e urina. A concentração de sulfatídeos está aumentada no fígado, rim, vesícula biliar e na urina de pacientes com LDM. Os níveis no fígado são pelo menos 10 vezes superiores aos normais, nos rins 10 a 75 vezes e na urina, 10 a 100 vezes superiores (von Figura *et al.*, 2001).

1.2.1.2. Manifestações Clínicas

A LDM é uma doença grave e pode ser dividida em três formas clínicas principais de acordo com a idade de início dos sintomas da doença (tabela 1).

Tabela 1. Principais características das formas clínicas encontradas na LDM (adaptado de von Figura *et al.*, 2001)

Forma	Idade de início dos sintomas	Principais manifestações clínicas
Infantil	0,5- 4	Dificuldade de caminhar, hipotonia dos membros, regressão mental, atrofia ótica, ataxia, dificuldade de falar
Juvenil	4- 16	Anormalidades na postura e no modo de caminhar, distúrbios emocionais e de conduta, atrofia ótica, declínio no rendimento escolar, regressão de linguagem
Adulta	> 16	Regressão mental, sintomas psiquiátricos, incontinência

Na forma infantil, a mais freqüente das três formas de apresentação da doença, os primeiros sintomas se manifestam entre os 12 e 24 meses de idade de

uma criança que vinha se desenvolvendo normalmente. Entre os primeiros sintomas estão a perda da habilidade motora, seguida por hipotonia, especialmente nos membros inferiores. Com a evolução progressiva do quadro clínico observa-se evidente regressão mental, ataxia, atrofia ótica e perda dos estímulos voluntários, incluindo a fala e a capacidade de engolir. Durante o decorrer da doença aproximadamente a metade dos pacientes apresentam convulsões, normalmente de caráter generalizado. Na etapa final da enfermidade a criança torna-se tetraplégica e o óbito ocorre entre o primeiro e o sétimo ano de vida (von Figura *et al.*, 2001; Mabe-Santana, 2006).

Na forma juvenil da LDM os primeiros sintomas clínicos manifestam-se entre os 4 e 12 anos de idade. A maioria dos pacientes apresenta sinais clínicos já nos primeiros anos escolares, como declínio no rendimento escolar, comportamento anormal e dificuldade no caminhar, além da pronúncia errada das palavras, enrijecimento muscular e tremores. As deteriorações intelectuais e motoras progridem de forma mais lenta que na forma infantil, sendo que os pacientes podem sobreviver entre 10 e 20 anos a partir do desenvolvimento dos sintomas.

Na forma adulta os primeiros sintomas podem aparecer a partir dos 15 anos, havendo também, pacientes cujos sintomas iniciam por volta dos 60 anos (Kawabata *et al.*, 2006; Mabe-Santana, 2006), e a evolução da doença pode seguir um curso rápido ou lento. A mudança na conduta e a deterioração mental progressiva é o que inicialmente chama a atenção dos familiares. O indivíduo torna-se ansioso, perturbado, apático e emocionalmente vulnerável. Verifica-se também desorganização do pensamento e falta de memória. Seu diagnóstico torna-se difícil à medida que esta gama de alterações comportamentais pode ser atribuída a problemas psiquiátricos. Associados a estas alterações verificam-se também dificuldade de movimentos, incontinência urinária e muitas vezes fecal.

1.2.1.3. Arilsulfatase A

1.2.1.3.1. Aspectos genéticos

O gene da ARSA com um tamanho total de 3,2 kb está localizado no locus q 13 do cromossomo 22 (Mabe-Santana, 2006). A estrutura do gene foi determinada por Kreysing e colaboradores, em 1990. Este é formado por oito éxons, que variam de 103 a 320 nucleotídeos e apresenta três potenciais sítios de glicosilação, dois no éxon 3 e um no éxon 6 (Gieselmann *et al.*, 1989).

A região promotora corresponde a aproximadamente 400 pares de base a montante do códon de iniciação, com posições típicas (GC boxes) para a interação com o fator de transcrição *Sp1*. Há três espécies de mRNAs descritas para a ARSA (von Figura *et al.*, 2001). Os transcritos gerados têm 2,1, 3,7 e 4,8 kb. Os diferentes tamanhos podem ser explicados pela terminação em diferentes sinais de poliadenilação na região 3' do gene (Kreysing *et al.*, 1993).

O isolamento do DNA complementar (cDNA) da ARSA foi realizado em 1989 a partir da enzima purificada por Waheed e colaboradores (1982). Este cDNA corresponde ao transcrito de 2,1 kb, o qual abrange 1521 pares de bases (pb) codificantes, gerando uma proteína de 507 aminoácidos (Stein *et al.*, 1989). A proteína contém um peptídeo sinalizador com 18 resíduos de aminoácidos, os quais são removidos no transporte até o retículo endoplasmático (RE).

A LDM pode ser causada por muitas mutações diferentes. Até o momento, cerca de 120 mutações diferentes foram descritas no gene *ARSA* (Mabe-Santana, 2006). Duas destas são as mais freqüentemente encontradas na população mundial, sendo responsáveis por aproximadamente 50% dos alelos mutantes. A primeira delas é uma troca do nucleotídeo adenina (A) por guanina (G), a qual destrói o sítio de ligação éxon/intron localizado no início do intron 2 (459+1G>A). A segunda é uma transição de citosina (C) para timina (T), causando a substituição do aminoácido prolina por leucina (P426L) no éxon 8 (Polten *et al.*, 1991).

Nesta DL não há claramente uma relação entre genótipo e fenótipo, ainda que algumas mutações possam ser relacionadas a determinados fenótipos mais comuns, como por exemplo, em homozigotos para alelos na mutação 459+1G>A,

que normalmente desenvolvem a forma mais grave da doença, enquanto pacientes em heterozigose, provavelmente desenvolverão a forma juvenil da doença; já os homozigotos para alelos da mutação P426L estarão, possivelmente, relacionados com formas tardias de LDM (Gieselmann *et al.*, 1989).

Até o momento, não existem estudos sobre a análise de mutações no gene *ARSA* em pacientes brasileiros diagnosticados com LDM, não havendo dados publicados sobre a prevalência das principais mutações e estimativas de seu padrão de distribuição em nosso país.

1.2.1.3.2. Aspectos bioquímicos

A *ARSA* é uma glicoproteína ácida em função do alto conteúdo de ácidos aspártico e glutâmico e significativa quantidade de prolina (Laidler *et al.*, 1985). Ela é sintetizada no retículo endoplasmático e sofre uma conversão de cisteína para C α formilglicina, formando dímeros. Estes dímeros são transportados para o complexo de Golgi, onde são reconhecidos e se ligam ao receptor manose-6-fosfato (RM6M). O complexo *ARSA*-receptor é transportado para os endossomas, onde se dissocia. O receptor retorna ao complexo de Golgi, e a *ARSA* é levada aos lisossomos. Os dímeros transformam-se, então, em octamêros (Martino *et al.*, 2005), sendo capazes de transformar o cerebrosídeo em galactosilceramida e liberando o sulfato, conforme figura 2.

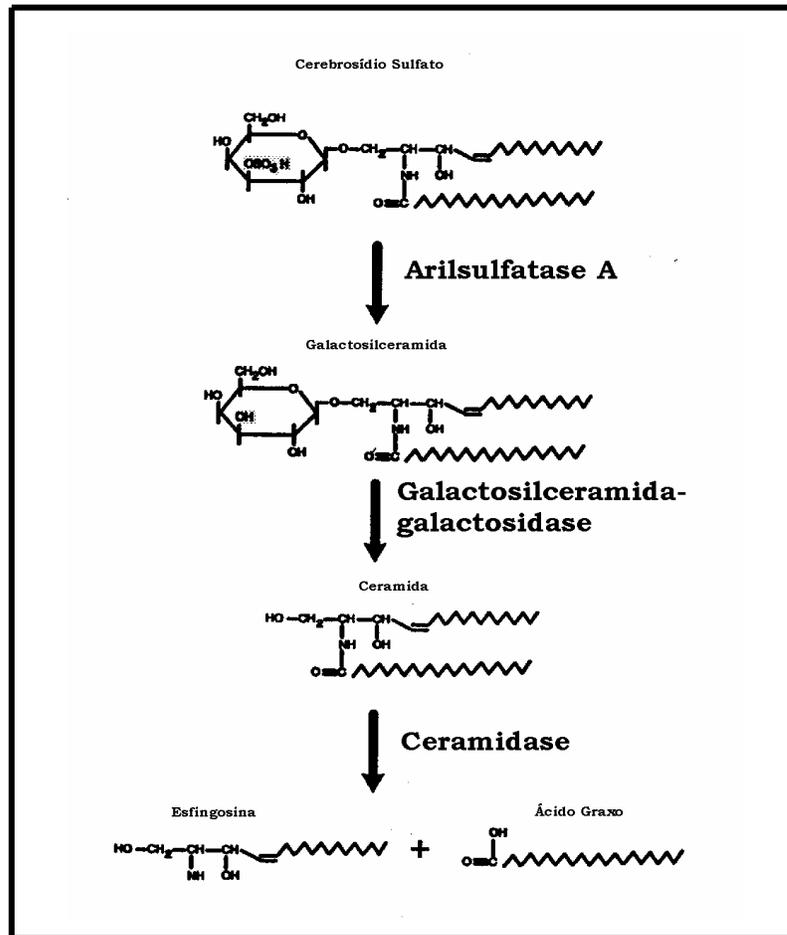


Figura 2. Rota de degradação de cerebrosidio sulfato (adaptado de Pereira, 1994).

O déficit dessa enzima faz com que essa reação seja interrompida, com o conseqüente acúmulo de sulfatídeo principalmente no SNC, mas também em outros tecidos, como o fígado, o baço e rim; conduzindo dessa forma, à destruição da mielina dos sistemas nervoso central e periférico.

A enzima possui três potenciais sítios de glicosilação localizados nos resíduos de asparagina (N) nas posições 158, 184 e 350 da proteína. No caso da ARSA, a fosforilação dos resíduos de manose parece estar restrita às posições N-158 e N-350. No entanto, a ausência dos oligossacarídeos nas posições N-158 ou N-350 torna o resíduo N-184 acessível à fosfotransferase, com conseqüente fosforilação dos resíduos de manose (Gieselmann *et al.*, 1994). Portanto, apesar de dois sítios, N-158 e N-350, serem responsáveis pela glicosilação *in vivo*, todos os três sítios são funcionais. Na ocorrência de uma alteração de DNA correspondente a

algum destes sítios (N-158 e N-350), os demais serão responsáveis pelo processo de glicosilação, garantindo a síntese e propriedades catalíticas normais da enzima (Matzner & Gieselmann, 2005).

Essa proteína apresenta uma polimerização dependente do pH celular. Em pH acima de 6,5, encontra-se na forma de monômero com peso molecular de aproximadamente 100 kDa, enquanto que em pH 4,5 forma dímeros. Na urina humana, a ARSA possui duas subunidades não idênticas, de 63 e 54 kDa, já no fígado, placenta e fibroblastos estas subunidades apresentam peso molecular variável de 55 e 64 kDa (von Figura *et al.*, 2001).

1.2.1.3.3. Outras condições que provocam atividade deficiente da ARSA

Pseudodeficiência de ARSA

A pseudodeficiência de ARSA (PD-ARSA) ocorre em indivíduos clinicamente saudáveis, que possuem atividade baixa da enzima, sem acúmulo de sulfatídeos ou aumento da sua excreção na urina. O termo pseudodeficiência, apesar de amplamente utilizado na literatura, não é muito adequado, uma vez que parece estar ocorrendo apenas uma deficiência aparente. No entanto, a deficiência da atividade de ARSA, nestes indivíduos, é real, mas suficiente para a manutenção do metabolismo normal (Gieselmann, 2007). A PD-ARSA é devida à homozigose para um alelo específico da ARSA, caracterizado por dois polimorfismos em *cis*: o primeiro, uma transição de adenina (A) para guanina (G), é responsável pela substituição de uma asparagina por uma serina no éxon 6 (N350S); e o segundo, 2723 A>G, é responsável pela perda do primeiro sinal de poliadenilação requerido para terminação da síntese do mRNA de 2,1kb do gene *ARSA* (Gieselmann *et al.*, 1989).

A importância do alelo para PD-ARSA é devido a sua alta frequência na população em geral (Hohenschutz *et al.*, 1989). Em um estudo espanhol, a frequência do alelo PD-ARSA foi de 12,7% (com total de homozigotos de 2/55 ou 3,6%) (Chabás *et al.*, 1993). A estimativa da frequência de portadores de mutações de PD-ARSA, em um estudo australiano que envolveu 73 indivíduos saudáveis, foi

de 20% (Nelson *et al.*, 1991). Estudos apontam que no Brasil esse dado fica em torno de 7,9% (Pedron *et al.*, 1999).

As possibilidades de combinações entre os alelos selvagens, de mutações de PD-ARSA e de mutações de LDM, e suas conseqüências, encontram-se resumidas na tabela 2.

Tabela 2. Principais associações entre genótipo e fenótipo em LDM e PD-ARSA

Genótipo	Fenótipo bioquímico		Fenótipo clínico
	Atividade da ARSA	Cromatografia de sulfatídeos	
N / N	Normal	Normal	Normal
N / PD-ARSA	Normal	Normal	Normal
N / LDM	Normal	Normal	Normal
PD-ARSA / PD-ARSA	Diminuída	Normal	Normal (Pseudodeficiência de ARSA)
PD-ARSA / LDM	Diminuída	Normal	Normal (Pseudodeficiência de ARSA)
LDM / LDM	Diminuída	Alterada	Alterado (Leucodistrofia metacromática)

N: alelo selvagem, PD-ARSA: alelo de pseudodeficiência de arilsulfatase A, LDM: alelo de leucodistrofia metacromática.

Deficiência de saposina B (Leucodistrofia Metacromática devido à deficiência do ativador de cerebrosideo sulfatase)

Em 1979, Shapiro e colaboradores, descreveram três pacientes de duas famílias com quadro clínico de LDM e atividade normal de ARSA, que viria a ser confirmado mais adiante como conseqüente à deficiência de saposina B (MIM #249900), que atua facilitando a degradação do cerebrosideo sulfato pela ARSA.

O quadro clínico desta condição, causado por mutações em *PSAP* (gene localizado em 10q22.1), é bastante semelhante ao da LDM clássica (em especial, das formas juvenis e adultas) causada pela deficiência de ARSA. Contudo os valores da atividade da ARSA em leucócitos e plasma são subnormais e em fibroblastos são normais. Entretanto, a degradação de sulfatídeos está marcadamente diminuída, o que é caracterizado pela excreção urinária elevada desse metabólito.

Deficiência de SUMF-1 (Deficiência Múltipla de Sulfatases)

Em todas sulfatases eucarióticas, um resíduo de formilglicina é encontrado na posição onde o cDNA prediz uma cisteína (Schmidt *et al.*, 1995). Na ARSA isso ocorre na posição da cisteína 69 (Cys69), onde a formilglicina é gerada pela oxidação do grupamento tiol em aldeído; modificação fundamental para que a sulfatase seja ativa (Dierks *et al.*, 1997). Essa modificação pós-traducional é realizada pela enzima codificada pelo gene *SUMF1*. Sua deficiência, portanto, torna todas as sulfatases inativas, causando a Deficiência de Múltiplas de Sulfatases (MIM #272200). Clinicamente, essa doença se manifesta através de sinais e sintomas combinados de LDM e Mucopolissacaridose, como: face grosseira, deterioração neurológica progressiva, neuropatia periférica desmielinizante e excreção elevada de glicosaminoglicanos e sulfatídeos na urina (Burk *et al.*, 1981; Burk *et al.*, 1984). Nestes casos o diagnóstico é realizado pela análise de algumas diferenças do quadro clínico, e, principalmente, pela significativa diminuição da atividade de outras sulfatases lisossomais além da ARSA, como por exemplo, a arilsulfatase B (ASB) (Mabe-Santana, 2006).

1.2.1.4 Sulfatídeo

A ARSA cliva vários substratos contendo o grupamento sulfato. Porém o principal substrato fisiológico são os sulfatídeos, uma classe de sulfogalactosilceramidas, que são sintetizados primariamente nos oligodendrócitos (no SNC) e nas células de Schwann (no SNP).

Sulfatídeos, junto com os galactosilceramidas, são importantes constituintes da bainha de mielina, estando localizados especialmente na superfície desta membrana e provavelmente ligados à proteína básica de mielina (BMP) por fortes interações iônicas (Arvanitis *et al.*, 1992). Estes estão envolvidos numa variedade de processos biológicos como: crescimento celular, reconhecimento célula-célula, plasticidade neuronal, morfogênese celular (Marcus *et al.*, 2006), e no transporte ativo de sódio, servindo de cofator para a Na/K-ATPase. Há também evidências de que os sulfatídeos estão implicados na ligação do GABA (ácido alfa-aminoglutárico), opióides e serotonina com os seus respectivos receptores, bem como na modulação

da atividade de diversas enzimas importantes para o sistema nervoso central (como fosfolipase A2, fosfodiesterase nucleotídeo-cíclica calmodulina-dependente e fosfatidilinositol fosfato 3-quinase) (von Figura *et al.*, 2001). Recentes estudos indicam uma provável ligação com apoptose celular, quando este substrato encontra-se em excesso. Zeng e colaboradores (2008) cultivaram células de neuroblastomas (NB) e suplementaram o meio com sulfatídeo exógeno. Este foi rapidamente internalizado por processos fagocíticos e os NBs começaram a entrar em apoptose evidenciada por despolarização da membrana mitocondrial e por translocação da fosfatidil-serina.

Os sulfatídeos são formados através da sulfatação da galactosilceramida (também chamada de galactocerebrósídeo) através de reação com 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS) (Hauser, 1964). Sua degradação envolve a dessulfatação pela ARSA, que é a primeira etapa na degradação da 3-sulfogalactosil-glicolípideos (Bosio *et al.*, 1996). Essa reação é dependente de saposina B (codificada pelo gene *PSAP*), que se complexa com os glicolípideos sulfatados com vista a facilitar o acesso da ARSA aos grupamentos sulfato.

1.2.2. Diagnóstico

O diagnóstico baseado em manifestações clínicas requer, para sua confirmação, análises bioquímicas. O parâmetro crítico para o diagnóstico de LDM é a deficiência da enzima ARSA (von Figura *et al.*, 2001).

O diagnóstico definitivo de LDM é obtido pela demonstração da deficiência da atividade da ARSA em leucócitos e cultura de fibroblastos. Inicialmente o ensaio enzimático era realizado na urina, usando como substrato cromogênico o 4-nitrocatecol sulfato (NCS), que, após hidrólise a 37°C, desenvolve uma coloração avermelhada, cuja intensidade é proporcional à atividade enzimática. No entanto, os resultados obtidos com urina não são seguros, porque a atividade da ARSA neste fluido é muito baixa (von Figura *et al.*, 2001).

Os substratos 4-nitrocatecol sulfato (NCS) e metilumbeliferil sulfato são comercialmente disponíveis e muito comumente utilizados para a determinação

colorimétrica e fluorimétrica, respectivamente. Essa determinação é bastante complicada pelo fato desses substratos também serem clivados por outras sulfatases, como a ASB, por exemplo. Baum e colaboradores (1959) desenvolveram uma técnica para medir a atividade da ARSA e ao mesmo tempo inibir a atividade da ASB e vice-versa. Através de concentrações elevadas de cloreto de sódio e pirofosfato de sódio foi possível medir a atividade da ARSA inibindo a ASB. Já a ARSA pode ser inibida utilizando-se como reagentes o acetato de bário (Baum *et al.*, 1959). Em 1987, Lee-Vaupel e Cozelmann, a fim de tornar a técnica de p-nitrocatecol-sulfato mais confiável, propuseram a modificação da técnica de Baum, utilizando outras condições que inibem a ASB, tais como incubação a 0°C e por um tempo maior (Shapira e Nadler, 1975; Lee-Vaupel e Cozelmann, 1987; von Figura *et al.*, 2001).

Quando a atividade da ARSA é baixa, outras condições que provocam atividade deficiente desta enzima devem ser investigadas, pois podemos estar diante de três situações distintas, resumidas na tabela 3.

Tabela 3. Relação entre fenótipos bioquímicos sugestivos de LDM e seus possíveis diagnósticos

Fenótipo Bioquímico			Fenótipo Clínico
Atividade ARSA	Excreção de sulfatídeos na urina	Atividade ARSB	
Diminuída	Elevada	Normal	LDM
Diminupida	Elevada	Elevada	DMS
Diminuída	Normal	Normal	PD-ARSA
Normal	Elevada	Normal	SAP B

O diagnóstico pré-natal da LDM é possível medindo-se a atividade da ARSA em vilosidades coriônicas, amniócitos, ou sangue de cordão umbilical. Além da avaliação bioquímica, o diagnóstico é também factível através da análise molecular (von Figura *et al.*, 2001). Em estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), analisou-se 7 gestações com suspeita de LDM, onde foram encontrados 2 fetos afetados para essa doença (Sanseverino *et al.*, 2001).

Para a correta interpretação dos resultados da atividade enzimática é necessário saber se os pais são portadores de um ou mais alelos para a pseudodeficiência em ARSA, pois essa condição pode diminuir significativamente a atividade enzimática de um feto que não é afetado por LDM. Nestes casos o diagnóstico pré-natal deve ser realizado através do teste de sobrecarga com sulfatídio radioativo em células cultivadas de amniócitos e através da análise de mutações (Mabe-Santana, 2006).

1.2.3. Tratamento

A LDM é uma doença sem tratamento curativo efetivo. As limitadas opções terapêuticas disponíveis visam retardar o curso clínico da doença e oferecer medidas para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes (Martino *et al.*, 2005).

O tratamento com dietas, drogas e reposição enzimática não obteve sucesso até o momento (von Figura *et al.*, 2001). O transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TACTH) tem como objetivo melhorar a evolução nos casos de LDM das formas juvenil ou adulta ou, nos casos da forma infantil tardia, melhorar o prognóstico neurológico. Isso, porém, pressupõe que os pacientes sejam tratados antes do início dos sintomas (Krivit *et al.*, 1999; Malm *et al.*, 1996). Após o avanço da doença, esta opção terapêutica não é mais indicada, já que não há benefícios relacionados à sua realização. Nos pacientes transplantados observou-se um aumento significativo na atividade da ARSA e diminuição dos níveis de sulfatídeos na urina, com um curso clínico da doença relativamente mais benigno. Existem esperanças de que o transplante de células do cordão umbilical nos primeiros meses de vida possa alterar positivamente a história natural da doença (Martin *et al.*, 2006)

Nos pacientes em que o tratamento com TACTH não é possível, em especial, naqueles em que a doença já se encontra em fase avançada, o objetivo central do manejo clínico deve ser focado na melhoria da qualidade de vida por meio de medidas gerais. Estas se baseiam em otimização do aporte nutricional (inclusive com a decisão ou não do uso de gastrostomia), terapia física (fisioterapia motora e

respiratória), manejo de complicações infecciosas e controle farmacológico das crises convulsivas (Balslev *et al.*, 1997).

Como outras enzimas lisossômicas, parte da ARSA é secretada no espaço extracelular, captada por células vizinhas e ligada a seu receptor manose-6-fosfato (M6PR). Este fenômeno, é a base para a terapia de reposição enzimática (TRE) para DLs. Todavia, o maior órgão alvo no tratamento de LDM é o sistema nervoso, e a presença da barreira hematoencefálica (BHE) dificulta a passagem de substâncias. Isso acaba por limitar a eficácia clínica da TRE uma vez que a enzima é administrada por via periférica (Kurai *et al.*, 2007a).

De qualquer forma, encontra-se em andamento um estudo clínico de TRE para LDM em fase I/II, realizado pela companhia biofarmacêutica escandinava Zymenex S/A, no qual pacientes europeus com a forma infantil tardia estão recebendo Metazym® (<http://www.clinicaltrial.gov> - Identifier: NCT00418561). Neste estudo, os pacientes devem receber uma infusão da enzima na primeira semana e posteriormente, a cada 15 dias, por um período de pelo menos 8 semanas. Resultados parciais ainda não foram divulgados.

1.2.3.1. Terapia gênica

Sob a perspectiva de nova opção de tratamento, encontra-se a terapia gênica (TG), que tem por objetivo introduzir modificações genéticas nas células dos pacientes para reverter o fenótipo patológico. O material genético pode ser transferido diretamente para as células do paciente (TG *in vivo*) ou as células são removidas do paciente, modificadas por inserção do material genético e transplantadas de volta ao paciente (TG *ex vivo*) (Nardi *et al.*, 2002).

A TG permite a administração direta do gene *ARSA* no cérebro, evitando assim a BHE. Esta barreira filtra as substâncias que passam do sangue para o cérebro e impede que a enzima presente na circulação sangüínea chegue ao sistema nervoso. Essa é uma das maiores limitações para o tratamento da LDM, seja por transplante de medula óssea, ou terapia de reposição enzimática.

Matzner e colaboradores (2000) propuseram um protocolo para tratamento da LDM onde utilizam um vetor retroviral com o gene *ARSA* humano para TG *ex-vivo* com transplante de medula óssea no modelo animal de LDM. Nesse protocolo, as células da medula óssea são retiradas e modificadas com o vetor. A vantagem desse procedimento sobre um transplante convencional é que o próprio indivíduo serviria como doador, eliminando a necessidade de encontrar-se um doador compatível e reduzindo o risco de rejeição. Neste estudo, 50% dos animais mantiveram os níveis sanguíneos de *ARSA* estáveis e dentro dos valores da normalidade por 12 meses, enquanto o restante teve um rápido decréscimo e alguns passaram a níveis não detectáveis. A atividade enzimática e a imuno-reatividade foi detectável em todos os órgãos dos animais com níveis estáveis de *ARSA* no soro.

Em um trabalho combinando terapia gênica e celular, Kawabata e colaboradores (2006) examinaram a viabilidade de realizar TG *ex vivo*, para LDM usando células progenitoras neurais (neurosferas). As neurosferas foram obtidas do estriato de embrião de camundongos transgênicos expressando GFP (*green fluorescence protein*) e foram infectadas com um vetor derivado do HIV, carregando o gene *ARSA* (HIV-*ARSA*). As neurosferas foram então inoculadas no hipocampo de camundongos adultos com LDM. Células GFP positivas foram detectadas, *in vivo*, no sítio de implantação, no estriato e ao longo do corpo caloso um mês após a injeção, sugerindo uma migração destas células para outros sítios. Marcação com anticorpos anti-MAP2 e anti-GFAP, demonstraram a diferenciação, respectivamente, em neurônios e astrócitos. Uma redução parcial do acúmulo do sulfatídeo foi confirmada no modelo animal. Análise imunohistoquímica, usando anti-*ARSA*, demonstrou a localização desta enzima tanto em células GFP positivas quanto negativas sugerindo que a *ARSA* foi liberada das neurosferas e captadas pelas células circundantes.

Luca e colaboradores (2005) geraram um vetor lentiviral carregando o gene *ARSA* e o gene repórter *GFP*. O vetor foi transferido para o hipocampo de camundongos modelos de LDM. Após, foi examinada a sua localização subcelular e a distribuição anatômica a *ARSA*. Nos camundongos tratados foi verificado um transporte da enzima, via axônio-dendrito, para outras regiões do cérebro. Também

houve uma diminuição do acúmulo de sulfatídeos nos lisossomos, sugerindo o uso de processos neurais para o transporte enzimático dentro do cérebro após a transferência gênica direta.

Estudos com vetores virais adeno-associados expressando a ARSA no cérebro de camundongos com LDM mostraram uma maior expressão enzimática no cérebro, cerebelo e tronco cerebral durante 3 a 15 meses após injeção *in situ*, nos ventrículos esquerdo, direito e no *vermis cerebellares*. Embora evidências *in vivo* tenham demonstrado muitos neurônios e astrócitos não transduzidos houve entrega da enzima nos lisossomos, diminuindo o acúmulo de substrato e prevenindo anormalidades neuropatológicas graves nesses animais (Sevin *et al.*, 2006).

Portanto, o sucesso terapêutico para a LDM depende da possibilidade da administração direta do gene *ARSA* no cérebro e da expressão estável do transgene possibilitando a correção da doença genética por um prazo longo. Na grande maioria das vezes a TG é feita com injeções diretas no cérebro, utilizando-se vetores virais. Embora essa técnica ultrapasse a BHE e já tenha sido obtida com sucesso em muitos casos, inclusive para LDM, existem relatos de formação de tumores devido à inserção do transgene no genoma, além da toxicidade do produto superexpresso às células receptoras, já descritos em outras doenças (Nakama *et al.*, 2006). Assim sendo, são necessárias alternativas que visem à manutenção da expressão do transgene, sem causar toxicidade e com riscos reduzidos.

1.3. Células Encapsuladas

A tecnologia de encapsulação celular é uma estratégia promissora para controlar, localizar e manter a entrega de produtos terapêuticos *in vivo* (Zimmermann *et al.*, 2005). A imobilização de células dentro de membranas semipermeáveis permite a difusão bi-direcional de nutrientes, oxigênio e produtos biologicamente ativos entre as células isoladas e o ambiente exterior. Assim, estas são protegidas das células do sistema imune e das imunoglobulinas (figura 3) (Orive *et al.*, 2002).

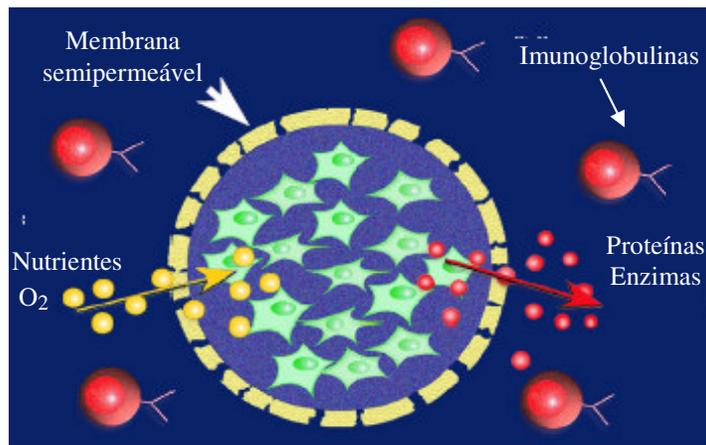


Figura 3. Sessão transversal esquemática do mecanismo de encapsulação celular.

Desde que Chang propôs a microencapsulação como uma alternativa para criar órgãos bio-artificiais há 44 anos (Chang, 1964), muitas tentativas para imobilizar células e outros materiais biológicos em diferentes tipos de cápsulas têm sido realizadas (Orive *et al.*, 2001). Uma variedade de polímeros, como quitosanas, poliacrilatos, poli-aminoácidos e poliamidas têm sido usados para fazer microcápsulas. O alginato é um dos polímeros que vem sendo muito utilizado para a encapsulação celular (Orive *et al.*, 2002; Orive *et al.*, 2003a; Orive *et al.*, 2003b).

As microcápsulas atualmente representam uma promissora abordagem tanto para o transplante de órgãos quanto para controlar a entrega de produtos terapêuticos. A estratégia de microencapsulação celular tem sido utilizada preferencialmente no desenvolvimento de órgãos bio-artificiais, no tratamento de desordens mendelianas, no tratamento do câncer e de outras desordens (Uludag *et al.*, 2000).

Para o tratamento de desordens mendelianas clássicas, como a hemofilia e as DLs, a implantação de células encapsuladas funciona como uma estratégia similar à reposição enzimática, como por exemplo, a entrega da β -glucuronidase para o tratamento de MPS VII (Ross *et al.*, 2000) e do hormônio do crescimento para tratar de nanismo (Chang *et al.*, 1999). Além disso, ela vem sendo usada para a entrega de produtos gênicos que podem modificar o quadro clínico, como por exemplo, a

entrega de dopamina e fatores neurotróficos para o tratamento da doença de Parkinson (Chang *et al.*, 1999; Lindvall & Wahlberg, 2008), fatores de crescimento de neurônios para tratar desordens neurodegenerativas (Hoffman *et al.*, 1993), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para infarto do miocárdio (Zhang *et al.*, 2007) e no tratamento de tumores (Visted *et al.*, 2001; Kuijlen *et al.*, 2006).

A eficácia terapêutica para o tratamento de MPS VII foi avaliada em experimentos *in vitro* e *in vivo*, com o uso de células microencapsuladas. Células humanas amnióticas epiteliais foram imortalizadas e transduzidas com um adenovírus contendo o gene da β -glucuronidase (GUSB). As microcápsulas foram implantadas no parênquima cerebral de ratos C3H e secretaram significantes quantidades de GUSB, neste local (Nakama *et al.*, 2006). Além disso, células encapsuladas produzindo a enzima GUSB foram introduzidas diretamente nos ventrículos laterais do cérebro de ratos mutantes para MPSVII por Ross e colaboradores (2000). Esta estratégia de entrega do produto gênico foi satisfatória pois, após o tratamento, houve reversão da patologia histológica, melhora no comportamento e melhora do ritmo circadiano.

A tecnologia de transferência celular é uma área em crescimento com grande impacto para doenças genéticas degenerativas que afetam o SNC. A administração direta de células geneticamente modificadas encapsuladas além de não produzir uma resposta imune ao material transplantado e eliminar a necessidade da enzima de passar a BHE, pode ainda simular diretamente a reposição enzimática sem a necessidade de injeções repetidas.

Baseado neste fato, nós desenvolvemos um método de encapsular células BHK superexpressando ARSA, objetivando corrigir, *in vitro*, a deficiência enzimática em fibroblastos de pacientes com LDM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro*, a correção da deficiência enzimática em fibroblastos de pacientes com Leucodistrofia Metacromática através de células imobilizadas em microcápsulas de alginado de sódio, superexpressando a enzima arilsulfatase A.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir um construto contendo o cDNA do gene que codifica a enzima ARSA no vetor pTracerTM-CMV2.

- Transferir o construto para a linhagem celular BHK (*Baby Hamster Kidney*) e selecionar clones superexpressando ARSA;

- Encapsular as células rBHK (superexpressando ARSA) em microcápsulas de alginado de sódio, caracterizando sua estabilidade e cinética de crescimento *in vitro*.

- Co-cultivar as células microencapsuladas com os fibroblastos de pacientes com LDM;

- Avaliar a correção da deficiência enzimática, por ensaio enzimático, e a redução do acúmulo de sulfatídeos nos lisossomo dos fibroblastos tratados, por microscopia eletrônica de transmissão.

3. ARTIGO

***In vitro* correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from Metachromatic Leukodystrophy patients after treatment with microcapsulated recombinant cells**

Valeska Lizzi Lagranha^{1,3}, Guilherme Baldo^{2,3}, Talita Giacomet de Carvalho³, Maira Burin⁴, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,4}, Ursula Matte³, Roberto Giugliani^{1,2,3,4}

¹ Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Centro de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Research supported by: FIPE-HCPA , CNPq, ONG Pela Vida and Gene Therapy Network - Millenium Institute - MCT

* Corresponding author: Valeska Lizzi Lagranha

Gene Therapy Center / Research Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, Brazil

Fone: + 55 51 21018838

Fax: +55 51 21018010

E-mail address: valleska@gmail.com

Manuscrito a ser submetido à revista: Molecular Genetics and Metabolism

ABSTRACT

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessive disorder due to arylsulfatase A (ARSA) deficiency that affects primarily the central nervous system. Ongoing treatments include enzyme replacement therapy and bone marrow transplantation, both limited in their effects due to the blood-brain barrier. An alternative approach would be the *in situ* implantation of encapsulated cells over expressing ARSA. Based on that, we tested the ability of encapsulated BHK cells over expressing ARSA to correct enzyme deficiency in MLD patients' fibroblasts. Three groups were analyzed: fibroblasts treated with ARSA-over expressing BHK cells (rBHK) trapped in alginate capsules (*capsules* group), fibroblasts treated with supernatant of non-encapsulated rBHK (*uptake control*) and fibroblasts treated with empty capsules (*empty* group). Untreated and normal fibroblasts were used as controls. rBHK were obtained by clone selection after non viral transfection with pTARSA-CMV2. ARSA activity was measured after 1, 2, 3 and 4 weeks of treatment and β -gal was used as reference enzyme. Statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's test. Normal fibroblasts showed ARSA activity of 23.9 +/- 2.01 nmol/h/mg of protein, whereas untreated MLD fibroblasts had the lowest ARSA activity (2.22 +/- 0.17). In the *empty* group, ARSA activity was equal to that of untreated fibroblasts (2.71 +/- 0.34). *Capsules* and *uptake control* groups showed higher enzymatic activity levels, compared to MLD untreated, 23.42 +/- 6.39 and 42.35 +/- 5.20, respectively (p<0,01 for all groups). Encapsulated rBHK clones show potential as a new therapeutic strategy for the treatment of MLD, reaching normal enzymes levels in human MLD fibroblasts.

Keywords: Alginate; Arylsulfatase A; Cell Encapsulation; Gene Therapy; Metachromatic Leukodystrophy.

INTRODUCTION

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an autosomal recessive lysosomal storage disease (LSD) caused by the deficiency of the enzyme arylsulfatase A. This deficiency results in the storage of the sulfatide (cerebroside 3-sulfate), which is a major component of myelin, and is involved in cell-to-cell interactions [1]. MLD occurs in about 1 per 40,000 live births [2]. This disease is characterized by myelin degeneration in both the central and peripheral nervous systems, leading to progressive motor and mental deterioration culminating in death in early childhood. In the late infantile form neurological symptoms start around 18 months of age, progress rapidly, and cause death within 3-5 years. Patients with juvenile and adult forms have a later onset of neurological signs, which initially progress slowly, but ultimately lead to the same fatal outcome [3].

The most successful treatment available for LSD at the present is enzyme replacement therapy (ERT) [4]. For LSD involving the central nervous system (CNS) the main problem to be overcome is how to target the enzyme to the defective neuronal and glial cells within the brain. Recent studies reported that MLD mice receiving weekly intravenous injection of recombinant ARSA showed improvements in the histopathology of peripheral tissues, while in the CNS the reduction of sulfatide was modest [5]. Although this therapy represents a promising approach for treatment, several shortcomings have been noted for other LSD [6-9] i) not all patients are suitable for enzyme therapy; ii) some organs and tissues are more readily corrected than others; and iii) the therapies are expensive, limiting the access to patients. Therefore, alternative strategies for the treatment of these diseases are required. Gene therapy represents an option since direct delivery of functional *ARSA* into the CNS may allow rapid onset and long-term expression within the nervous system. Experiments on animals have shown that direct parenchymal enzyme administration by using viral vector results in long-term sustained expression of the missing protein and therapeutic benefit [10-12].

An alternative approach to direct delivery is represented by the implantation of encapsulated cells into the brain. This strategy has been used to deliver dopamine and neurotrophic factors for treatment of Parkinson disease [13-14], β -glucuronidase for mucopolysaccharidosis type VII [15-16], and for treatment of tumors [17-18]. Such approach is based on the fact that cells (genetically modified or not) encapsulated within a biocompatible semipermeable membrane become protected from the large immune system mediators [15]. This allows the enzyme secreted by these cells to be uptaken by surrounding deficient cells in the CNS. Thus, it simulates, *in situ*, the enzyme replacement without the need for repeated injections or for the enzyme to pass the blood-brain barrier. Based on that, we developed a method for encapsulating BHK cells over expressing ARSA, aiming to correct, *in vitro*, the enzyme defect in fibroblasts derived from MLD patients.

MATERIALS AND METHODS

Vector construction

The human wild-type ARSA cDNA [19] from plasmid pBEH HT14/CP8 (kindly provided by Dr. Volkmar Gieselmann, University of Bonn, Germany) was cloned into pTracer/CMV2 plasmid (Invitrogen, USA). The vector construction was prepared by cloning the *EcoRI* fragment (nucleotides -62 to +1611 relative to ATG initiation codon) into the *EcoRI* site of the pTracer/CMV2 expression vector. The created plasmid pTARSA/CMV2 was inserted into DH5 α *E. coli* (Invitrogen, USA) for transformation. Recombinant clones were confirmed by PCR and orientation was checked with *ClaI* and *KpnI*.

Transfection of BHK cells

BHK cells were grown to about 90-95 % confluence in DMEM (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, USA), and 2 mM L-glutamine (Gibco, USA). Two non viral methods of transfection, lipofection using Lipofectamine™ (Invitrogen, USA) and polifection using JetPEI™ (PolyPlus Transfection, French) were

tested for introduction of the pTARSA/CMV2 into BHK cells. Stable clone selection was performed with 400 µg/mL of Zeocin™ (Invitrogen, USA). Clones were isolated and ARSA activity was measured in the supernatant 1, 2 (transient transfection), and 30 days (stable transfection) after transfection. A clone over expressing ARSA was expanded under standard tissue culture conditions for later encapsulation.

ARSA activity assay

Cultured cells were harvested and washed twice in PBS. They were then sonicated in distilled water and centrifuged to eliminate cellular debris. After quantifying protein using the Lowry protein assay [20] ARSA enzyme activity was measured by colorimetric assay, with some changes [21]. In brief, the protein extract was incubated at 0 °C with 10 mM *p*-nitrochatecol-sulfate. After 5 h reaction was stopped by the addition of 1 N NaOH and ARSA activity was measured at 515 nm in a spectrophotometer (U-2001 Spectrophotometer, Hitachi, Japan). ARSA activity secreted from cells was measured by testing 80 µL of culture medium. Specific enzyme activities were calculated as nmol/h/mg of protein. β-galactosidase (β-gal) was assayed as reference enzyme [22].

Cell encapsulation

Procedures were carried out as previously described by Ross et al. [15]. Briefly, cells were mixed with 1.5 % sodium alginate (Sigma-Aldrich, Germany) at 5×10^5 cells/mL and extruded through a Encapsulation Unit, type J1 (Nisco, Switzerland) attached to JMS Syringe Pump (Singapore). Droplets were sheared off with an air flow of 4 L/min delivered to the tip of the needle and the rate of infusion was 40 mL/min. The droplets fell into a bath of 125 mM CaCl₂ and ionically cross-linked with Ca²⁺ to form solid spherical hydrogel beads containing embedded cells. In each well capsules were produced from a volume of 400 µL of cell suspension. The number of capsules generated was counted using an inverted microscope, and the number of cells per capsule was estimated by the proportion between the total number of cells and the number of capsules produced.

Cell encapsulation was carried out under sterile conditions. The resulting capsules were maintained under normal tissue culture conditions for 24 h and then were co-cultured with fibroblasts derived from MLD patients.

Uptake of ARSA over expressed in BHK cells by fibroblasts derived from MLD patients

To perform cross-correction experiments, cultures of patients' fibroblasts obtained from the Medical Genetics Service (MGS) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), were expanded in DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S, at 37 °C in humidified 5 % CO₂ incubator until reaching 70-80 % confluence. Three treatments were examined in these fibroblasts: co-culture of microcapsules and fibroblasts (group: *capsules*), culture with media supplemented with clone's supernatant (group: *uptake control*), and culture with capsules without cells (group: *empty*). Untreated fibroblasts were used as negative controls and fibroblasts of individuals not affected with MLD as positive controls. All tests were performed at least in triplicates and fibroblasts were treated for 1, 2, 3, and 4 weeks. After each time point, fibroblasts were analyzed for ARSA and β -gal activities and at the third week fibroblasts were analyzed through transmission electron microscopy (TEM).

In the *capsules* group microcapsules were collected and mixed for about 5-10 minutes in 100 mM sodium citrate to promote its solubilization. Encapsulated clones were analyzed for ARSA and β -gal activities, cell number, and viability. To ensure that there was no capsule's disruption with cell extravasation into the environment, the selection of fibroblasts with 600ug/mL of ZeocinTM was performed as described above.

In the *uptake control* group, clones were incubated in zeocin-free medium 24 h prior to the media collection. After 24h supernatant was collected, centrifuged at 2,000 x *g* at 4 °C for 10 minutes, filtered, and then added to fibroblasts containing 1 volume of DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % P/S. This procedure was performed every 3 days. To ensure that any BHK cells were taken together with

media supplemented by the clones, a selection of the fibroblasts with 600 ug/mL of Zeocin™ was performed for 1-2 weeks.

Electron microscopy

Treated fibroblasts and controls were fixed in 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, postfixed in 1 % osmium tetroxide (OsO₄), and embedded in Epon. The section was stained with lead citrate and uranyl acetate. The ultrasections were analyzed in JEOL Transmission Electron Microscopy (USA), model EXII, 120 kV.

To examine the surface morphology of the microcapsules, scanning electron microscopy (SEM) was performed after fixing the capsules with glutaraldehyde 25 % and dehydrating with acetone. Microcapsules were then coated with gold for viewing on JOEL JSM-6060 scanning electron microscope (USA).

Ethical aspects

This protocol was approved by the internal IRB under the number GPPG 06-413. Patient's fibroblasts were used unidentified, without the need for informed consent.

RESULTS

Cell transfection

The pTARSA-CMV2 vector was used on both lipo and polifection procedures. ARSA activity in untransfected BHK cells was 1.40 ± 0.28 nmol/h/mL. After 48 h transient expression using PEI was 36.45 ± 0.97 (figure 1). However, 30 days after zeocin selection we were not able to obtain a stable clone. On the other hand lipofection had lower transient expression values (3.52 ± 0.97 nmol/h/mL) when compared to polifection ($p < 0.01$), but allowed us to obtain eight stable clones after 30 days, with ARSA activity ranging from 7 to 131 times higher than untransfected cells (data not shown). The clone that presented higher expression (183.94 nmol/h/mg of protein) was used on the subsequent experiments (rBHK).

Cell encapsulation

Cell encapsulation protocol was optimized for producing small size beads that could maintain integrity, stability, and cell viability. Better results were obtained using a cell infusion rate of 40 mL/h and air jet flow of 4 L/min (figure 2). Using these parameters and beginning with 2×10^5 cells in 400 μ L we were able to make $1,400 \pm 210$ capsules/mL containing 1.0×10^3 cells/capsule. This corresponds to the total amount of encapsulated cells added per well. Alginate microcapsules were measured using ImageProPlus[®] software and results varied from 300 to 800 μ m with a mean size of 400 μ m. Scanning electron microscopy revealed interconnecting fissures in the surface morphology that confirmed a porous matrix (figure 3) of the capsules produced.

To evaluate enzyme release from alginate beads we compared ARSA activity in the supernatant of encapsulated and non-encapsulated rBHK clones. Beta-galactosidase (β -gal) was used as reference enzyme. Considering the values obtained in non-encapsulated cells as 100 %, ARSA and β -gal activity in the supernatant 24 h after encapsulation was 40.45 ± 2.62 % and 37.00 ± 5.80 %, respectively. After 5 days these values were slightly increased (43.5 ± 7.20 % for ARSA and 39.21 ± 2.10 % for β -gal) and were proportional to the observed cell growth (figure 4).

Reversion of ARSA deficiency in MLD fibroblasts

We tested enzyme activity in MLD fibroblasts during four weeks of co-culture with the encapsulated rBHK clones (*capsules* group). As negative control, we used empty capsules (*empty* group) and as positive control we supplemented culture media with 50 % of the supernatant previously maintained for 24 h with the rBHK (*uptake control* group).

Results obtained in *capsules* and *uptake control* groups demonstrated that fibroblasts were able to capture the enzyme from media (table 1). In the first weeks we were able to detect a small increase in ARSA activity in treated MLD fibroblasts. After 3 weeks ARSA levels reached 16.06 ± 2.01 and 18.28 ± 1.84 nmol/h/mg of protein in *capsules* and *uptake control* groups respectively, whereas the untreated

cells present a mean activity of 2.22 ± 0.17 nmol/h/mg of protein ($p < 0.01$). After four weeks ARSA activity values showed a slight increase in the *capsules* group (23.42 ± 6.39 nmol/h/mg of protein) but in the *uptake control* group it was even higher than normal fibroblasts (23.9 ± 2.01 nmol/h/mg of protein), reaching 42.35 ± 5.20 nmol/h/mg of protein ($p < 0.01$). *Empty* group presented values similar to untreated fibroblasts during the whole experiment.

ARSA activity in rBHK clones during co-culture experiments

Simultaneously to co-culture experiments we performed ARSA activity in the rBHK clones used for encapsulation and supernatant collection for both *capsules* and *uptake control* groups.

On the non-encapsulated rBHK clones used for supernatant collection for the *uptake control* group ARSA activity remained constant during the four weeks (data not shown). On the other hand, enzyme activity levels of encapsulated rBHK clones used in the *capsules* group had a significant decrease after 3 and 4 weeks (figure 5). This decrease was not due to a loss of cell mass, as these numbers actually increase within the capsules with cell viability ranging from $93.9 \% \pm 2.6$ in week 1 to $81.0 \% \pm 5.9$ in week 4. In addition, reference enzyme values were similar in the four weeks. It is interesting to notice that the decrease of enzyme activity in the rBHK clones corresponds to the increase of ARSA activity in treated MLD fibroblasts (figure 6).

Electron Microscopy

To detect changes in sulfatide storage we performed ultrastructural analysis in fibroblasts (figure 7). Untreated MLD fibroblasts showed lysosomes with lamelated shaped storage compounds and a large number of vacuoles with or without granules. The cytoplasmatic inclusions seem to have relatively low electron density and some contained small arranged circular aggregates of lamelated material that resembled the “tuff-stone” inclusions (figure 7C) previously described in oligodendrocytes and Schwann cells of human MLD cases [23-24]. Normal fibroblasts showed some degree

of lysosomal storage, but few presented the shaped lamellar structures. After treatment with encapsulated rBHK clones and supernatant of non-encapsulated rBHK clones, lysosomal storage in fibroblasts appears to have decreased, although many inclusions were still present in these groups with the characteristic shaped lamellar aspect. In some cells a homogeneous area was noted, corresponding to degraded sulfatide.

DISCUSSION

In this study we aimed to evaluate the effectiveness of a combination of cellular and gene therapies as a therapeutic option for MLD using encapsulated recombinant BHK cells (rBHK). We chose this approach since MLD's involvement of the CNS represents an unsolved challenge. Several studies have shown the ability of cell encapsulation for CNS and lysosomal disorders. Alginate intraventricular implants have been successfully applied to the treatment of MPS VII [15] and intraperitoneal implantation of encapsulated myoblasts over expressing iduronate sulfatase for the treatment of MPS II showed beneficial results in animal model, reducing glycosaminoglycans storage [25].

Cell transfer technology is a growing area with great impact for degenerative genetic diseases that affect the CNS. The direct administration of genetically engineered encapsulated cells besides giving immunoprotection to the transplanted material can also simulate direct enzyme replacement without repeated injections and eliminating the need for the enzyme to pass through the blood brain-barrier (BBB).

Our results showed that lipofection presented a low transient ARSA expression while enzyme activity levels reached after polifection were 30 times higher than those of non-transfected BHK cells. Although transient expression using PEI has been significantly different of the Lipofectamine™ 2000 ($p < 0.01$), this method did not allow for selection of stable rBHK ARSA-over-expressing clones after selection with Zeocin™. On the other hand, lipofection allowed the selection of a stable rBHK clone that had enzyme activity levels 131 times higher than that of non-transfected BHK cells.

The pTARSA-CMV2 vector has a gene that confers resistance to Zeocin™ antibiotic and is unable to self-replicate in eukaryotic cells. Perhaps, this is a possible reason for not obtaining stable rBHK clones over-expressing ARSA after PEI-mediated gene transfer. A non-integrating plasmid can be degraded by nucleases or diluted by cell division if lacking a eukaryotic replication origin, thus reaching undetectable levels in a short period of time [26]. The characteristics of pTARSA-CMV2 added to the high rate of cell proliferation of BHK cells and the time taken for Zeocin™ of 2 to 6 weeks for a complete selection may have contributed to a dilution in plasmid copy number per cell, resulting in decreased levels of ARSA activity in rBHK clones.

Nevertheless, ARSA expression in cells transfected with Lipofectamine™ 2000 was maintained throughout the selection period with Zeocin™. This was probably due to the transgene insertion into the host genome, a possibility considered in the manufacturer's protocol by using Lipofectamine™ 2000 (Catalog nº V885-01, V885-20, Version C 082901 - Invitrogen Life Technologies). Plasmids' spontaneous integration in the host genome can occur by recombination, although this happens in a small fraction of transfected cells [27].

The expression of ARSA cDNA in BHK cells presents the same pattern as ARSA synthesized in human skin fibroblasts, including both glycosylated and deglycosylated forms [19]. In addition, efficient phosphorylation has also been reported [5]. ARSA expression in BHK cells transfected with pTARSA-CMV-2 vector is able of degrading its artificial substrate, both in cell lysate as in the supernatant, showing that the enzyme is synthesized and secreted correctly by these cells, as previously reported by Stein et al. [19].

After standardizing the parameters for rBHK encapsulation we found that ARSA is released to the extracapsular medium in values around 40 % of those found in the supernatant the same number of non-encapsulated rBHK cells. β -gal activity also showed an average value of 37 % that of non-encapsulated cells. Thus, approximately half of the enzyme cannot be released to the extracapsular medium or is somehow inactivated. In either case, this is not a problem for MLD treatment since

this in an autosomal recessive disorder. Therefore, only half the normal levels of enzyme activity should be enough to avoid symptoms, as corroborated by heterozygous individuals.

After treating the fibroblasts with encapsulated rBHK and with the supernatant of rBHKs our results show that the enzyme is uptaken by the patients' fibroblasts, correcting the enzyme deficiency *in vitro* and reducing the storage. In the first weeks we detected a small increase in ARSA activity of treated fibroblasts. After the third week however, ARSA levels achieved significant values within the *capsules* and *uptake control* groups when compared to mean of ARSA activity in untreated fibroblasts. After the fourth week ARSA activity were still increased in the *capsules* group, but in the *uptake control* group this increase exceeded the mean of normal fibroblast ($p < 0.01$). Although this difference was statistically significant, it does not possess any clinical relevance as the values remain within the normal reference values (20 to 50 nmol/h/mg of protein).

It is worth noticing that after the third week ARSA activity decreased by approximately 50 % in encapsulated rBHK clones compared to the beginning of treatment. This decrease is not due to cell death, as viability was 81 % at the fourth week and β -gal levels remained constant in the same samples. Thus, we can suggest that this is due to gene silencing. CMV promoter is the strongest promoter known so far [26, 28-29] resulting in high expression levels in several cell types. However, it has been frequently documented that its transcription stable units are silenced during time [30]. The inactivation of this promoter has been described both *in vivo* and *in vitro*, associated with extensive methylation [30-33]. However, it is not clear why this inactivation has not occurred in non-encapsulated rBHK. Maybe Zeocin selection throughout the experiment, except during the 24 hours used for collecting the media to treat the fibroblasts, has prevented plasmid silencing. Anyway, studies that confirm the silencing should be conducted.

ARSA activity in encapsulated rBHKs (*capsules* group) showed a peak in the first two weeks and a decline from the third week that is paralleled by an increase in ARSA activity levels in the treated fibroblasts. These data suggest an alteration of the

M6P receptors (M6PR) that are responsible by the uptake of lysosomal hydrolases through the mannose 6-phosphate residue (M6P). In gene therapy for lysosomal disorders enzyme levels must be controlled to avoid saturation of M6P receptors, which can result in the decreased activity of other enzymes depending on this pathway. Therefore, vectors with high levels of expression do not always show the greatest efficiency in the correction of the enzyme defect [34-35].

In our experiment, fibroblasts of the *uptake control* group showed a similar pattern to the fibroblasts of the *capsules* group, that is, enzyme levels rising from the third week but without a decrease in the amount of enzyme available in the media. This is against the hypothesis of M6PR saturation, which was also rejected by Capotondo et al. [36]. These authors infected hematopoietic stem cells and an animal model over-expressing ARSA using a lentiviral vector to assess the consequences of ARSA over expression. Their results show that high levels of the enzyme does not lead to receptors' saturation, does not affect the activation of other sulfatases, and does not influence the clonal proliferation and multi-lineage differentiation of hematopoietic stem cells. In view of this we can suggest that there may have been an increase in the expression of M6P receptors due to the increase in availability of ARSA in the medium. This could also explain the fact that β -gal levels in treated fibroblasts also increase from 373.63 ± 59.08 nmol/h/mg of protein prior to treatment to 561.36 ± 80.80 nmol/h/mg of protein, after the fourth week ($p < 0.05$). Although this increase is not clinically relevant, as these values are within normal range (395 to 1440 nmol/h/mg of protein), it can be considered as an evidence of a better enzyme uptake due to an increase in the number of receptors.

However more studies are needed to confirm our findings. M6P receptor levels evaluated by Real Time PCR can prove whether this receptor is over expressed or not. Inhibition uptake assays with concomitant measurement of ARSA levels in the supernatant can also be performed to obtain data of levels of M6P receptors saturation. A longer period of co-culture should also be analyzed to verify ARSA levels on both rBHK and fibroblasts.

Consiglio et al. [37] proposed a similar protocol for MLD using encapsulated cells. C2C12 myoblasts mice were transduced using a retrovirus containing human

ARSA cDNA. After gene transfer cells presented 15 and 5 times higher ARSA levels in the cell lysate and supernatant, respectively. Cells were encapsulated in polyether-sulphone fibers and medium from these cells was collected and used for *in vitro* correction of oligodendrocytes derived from MLD *knockout* mice. ARSA uptake measured by sulfatide overload was 80% of physiological levels, which was sufficient to reestablish sulfatides normal metabolism.

Ultrastructural analysis in untreated MLD fibroblasts revealed a higher number of vacuoles (some presenting reticulated granules) comparing to normal cells. These findings are in agreement to other reports that also presented these features in MLD cells [23, 24, 38, 39]. Besides, untreated cells presented lysosomes with lamellar inclusions similar to those found in Schwann cells from MLD patients [24]. After treatment with both encapsulated rBHK cells or cell supernatant we were able to observe mild decrease in the amount and morphology of stored material. In some cells lamellar inclusions seemed to decrease, which suggests a reduction in lysosomal sulfatide storage due to increased ARSA activity reached after treatment. Although some of these structures had already been described in normal cells [38], we verified that stored material in normal cells was more homogeneous. Treated fibroblasts presented intermediate characteristics to both controls, suggesting that expressed ARSA was able to be uptaken by deficient cells and to degrade its natural substrate.

Several other studies have shown the ability of encapsulated cells to release proteins of interest both in animal models and in clinical trials. Encapsulated cells were used for delivering neurotrophic factors for Parkinson's disease [14] in mice. A phase I protocol was concluded for Huntington's disease evaluating the safety of intraventricular administration of capsules containing rBHK cells over expressing CNTF (ciliary neurotrophic factor). Capsules were changed each 6 months for a two-year period and no signs of toxicity were observed. Electrophysiological changes were observed and correlated to the amount of released CNTF [40].

In vitro treatment with encapsulated cells was able to revert ARSA deficiency in MLD skin fibroblasts. Our results indicate that this strategy has potential as a new therapeutic approach for treating this disease. The implant of microcapsules within

the brain could be an option to be considered along with ERT. Cell encapsulation would target the CNS whereas ERT would reach the peripheral nervous system. However more studies are still needed using MLD animal model to corroborate our findings.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Volkmar Gieselmann for kindly providing the pBEH HT14/CP8 vector with human ARSA cDNA. This research was supported by grants from Gene Therapy Network/Millennium Institute/MCT, CNPq, FIPE-HCPA and ONG Pela Vida.

REFERENCES

- [1] J. Marcus, S. Honigbaum, S. Shroff, K. Honke, J. Rosenbluth, J.L. Dupree, Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure, *Glia* 53 (2006) 372-381.
- [2] P. Mabe-Santana, La enfermedad de Krabbe y la leucodistrofia metacromática, in: P. Sanjurjo, A. Baldellou (eds), *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*, Ed. Ergon, 2006, pp 639-650.
- [3] K. Von Figura, V. Gieselmann, J. Jaeken Metachromatic Leukodystrophy, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York: McGraw-Hill, 2001, pp 3695-3724.
- [4] R.J. Desnick, E.H. Schuchman, Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders, *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 954-66.
- [5] U. Matzner, E. Herbst, K.K. Hedayati, R. Lüllmann-Rauch, C. Wessig, S. Schröder, C. Eistrup, C. Möller, J. Fogh, V. Gieselmann, Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1139-52.
- [6] G. Altarescu, S. Hill, E. Wiggs, N. Jeffries, C. Kreps, C.C. Parker, R.^o Brady, N.W. Barton, R. Schiffmann, The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease, *J Pediatr* 138 (2001) 539-47.
- [7] E.D. Kakkis, E. Schuchman, X. He, Q. Wan, S. Kania, S. Wiemelt, C.W. Hasson, T. O'Malley, M.A. Weil, G.A. Aguirre, D.E. Brown, M.E. Haskins, Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I, *Mol. Genet. Metab.* 72 (2001) 199-208.

- [8] J.E. Wraith, Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I: progress and emerging difficulties, *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001)245-50.
- [9] J. Pérez-Calvo, P. Giraldo, G.M. Pastores, M. Fernández-Galán, G. Martín-Nuñez, M. Pocoví, Extended interval between enzyme therapy infusions for adult patients with Gaucher's disease type 1, *J. Postgrad. Med.* 49 (2003) 127-31.
- [10] A. Consiglio, A. Quattrini, S. Martino, J.C. Bensadoun, D. Dolcetta, A. Trojani, G. Benaglia, S. Marchesini, V. Cestari, A. Oliverio, C. Bordignon, L. Naldini, In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice, *Nat. Med.* 7 (2001) 310-6.
- [11] M.A. Passini, J.H. Wolfe, Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector, *J. Virol.* 75 (2001)12382-92.
- [12] M.A. Passini, S.L. Macauley, M.R. Huff, T.V. Taksir, J. Bu, I.H. Wu, P.A. Piepenhagen, J.C. Dodge, L.S. Shihabuddin, C.R. O'Riordan, E.H. Schuchman, G.R. Stewart, AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease, *Mol. Ther.* 11 (2005) 754-62.
- [13] H. Yoshida, I. Date, T. Shingo, K. Fujiwara, Y. Miyoshi, T. Furuta, T. Ohmoto, Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells, *Cell Transplant.* 8 (1999) 427-30.
- [14] O. Lindvall, L.U. Wahlberg, Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* 209 (2008) 82-8.
- [15] C.J. Ross, M. Ralph, P.L. Chang, Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells, *Exp. Neurol.* 166 (2000) 276-86.
- [16] H. Nakama, K. Ohsugi, T. Otsuki, I. Date, M. Kosuga, T. Okuyama, N. Sakuragawa, Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells, *Tohoku J. Exp. Med.* 209 (2006) 23-32.
- [17] T. Visted, R. Bjerkvig, P.O. Enger, Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies, *Neuro Oncol.* 3 (2001) 201-10.
- [18] J.M. Kuijlen, B.J. de Haan, W. Helfrich, J.F. de Boer, D. Samplonius, J.J. Mooij, P. de Vos, The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors, *J. Neurooncol.* 78 (2006) 31-9.
- [19] C. Stein, V. Gieselmann, J. Kreysing, B. Schimidt, R. Pohlmann, A. Waheed, H.E. Meyer, J.S. O'Brien, K. Von Figura, Cloning and expression of human arylsulfatase A, *The J. of Biol. Chemistry* 264(1989) 1252-1259.

- [20] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [21] M. Lee-Vaupel, E. Conzelmann, A simple chromogenic assay for arylsulfatase A, *Clin. Chim. Acta* 164 (1987) 171-180.
- [22] K. Suzuki, Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis, in: R.H. Glew, S.P. Petersen (Eds), *Practical enzymology of the sphingolipidosis*, New York, Alan R Liss., 1977.
- [23] D. Wittke, D. Hartmann, V. Gieselmann, R. Lüllmann-Rauch, Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution, *Acta Neuropathol.* 108(4) (2004) 261-71.
- [24] K. Saravanan, H. Büssow, N. Weiler, V. Gieselmann, S. Franken, Spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy, *Neurosci. Methods* 161(2) (2007) 223-33.
- [25] A. Friso, R Tomanin, S. Alba, N. Gasparotto, E.P. Puicher, M. Fusco, G. Hortelano, J. Muenzer, O. Marin, F. Zacchello, M. Scarpa, Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts, *J. Gene Med.* 7 (2005) 1482-91.
- [26] M.M.B. Molinas, *Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension: Process Characterization and Optimization by Applying Invasive Nucleotide and Non-invasive Electronic Nose Technology*. Doctoral Thesis, 2005.
- [27] QIAGEN, *The QIAGEN transfection resource book*, 1999.
- [28] J.A. Nelson, C. Reynolds-Kohler, B.A. Smith, Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene, *Mol. Cell Biol.* 7 (1987) 4125-4129.
- [29] S. Andersson, D.L. Davis, H. Dahlbäck, H. Jörnvall, D.W. Russell, Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 8222-8229.
- [30] G. Grassi, P. Maccaroni, R. Meyer, H. Kaiser, E. D'Ambrosio, E. Pascale, M. Grassi, A. Kuhn, P. Di Nardo, R. Kandolf, J.H. Küpper, Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87, *Carcinogenesis* 24(10) (2003) 1625-35.
- [31] C. Teschendorf, K.H. Warrington Jr, D.W. Siemann, N. Muzyczka, Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus, *Anticancer Res.* 22(6A) (2002) 3325-30.

- [32] A. Maass, S.J. Langer, S. Oberdorf-Maass, S. Bauer, L. Neyses, L.A. Leinwand, Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells, *J Mol Cell Cardiol* 35(7) (2003) 823-31.
- [33] A.R. Brooks, R.N. Harkins, P. Wang, H.S. Qian, P. Liu, G.M. Rubanyi, Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle, *J. Gene Med.* 6(4) (2004) 395-404.
- [34] D.S. Anson, J. Bielicki, J.J. Hopwood, Correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by retroviral-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase gene, *Hum. Gene Ther.* 3(4) (1992) 371-9.
- [35] S.H. Cheng, A.E. Smith, Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders, *Gene Ther.* 10(16) (2003) 1275-81.
- [36] A. Capotondo, M. Cesani, S. Pepe, S. Fasano, S. Gregori, L. Tononi, M.A. Venneri, R. Brambilla, A. Quattrini, A. Ballabio, M.P. Cosma, L. Naldini, A. Biffi, Safety of arylsulfatase A overexpression for gene therapy of metachromatic leukodystrophy, *Hum. Gene Ther.* 18 (2007) 821-36.
- [37] A. Consiglio, S. Martino, D. Dolcetta, G. Cusella, M. Conese, S. Marchesini, G. Benaglia, L. Wrabetz, A. Orlacchio, N. Déglon, P. Aebischer, G.M. Severini, C. Bordignon, Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts, *J. Neurol. Sci.* 255 (2007) 7-16.
- [38] E. Kamensky, M. Philippart, P. Cancilla, S.P. Frommes, Cultured skin fibroblasts in storage disorders: An analysis of ultrastructural features, *Am. J. Pathol.* 73(1) (1973) 59-80.
- [39] I. Schott, D. Hartmann, V. Gieselmann, R. Lüllmann-Rauch, Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice, *Virchows Arch.* 439(1) (2001) 90-6.
- [40] J. Bloch, A.C. Bachoud-Lévi, N. Déglon, J.P. Lefaucheur, L. Winkel, S. Palfi, J.P. Nguyen, C. Bourdet, V. Gaura, P. Remy, P. Brugières, M.F. Boisse, S. Baudic, P. Cesaro, P. Hantraye, P. Aebischer, M. Peschanski, Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum, Gene Ther.* 15(10) (2004) 968-75.

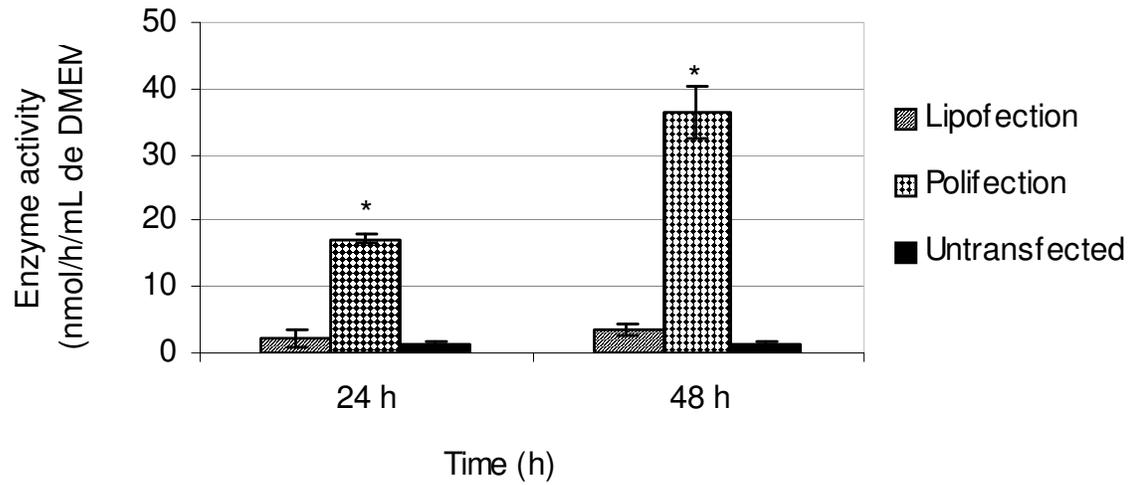


Figure 1. ARSA activity (nmol/h/mL of DMEM) in BHK cells untransfected, 24h and 48h after transfection using lipo and polifection. Values represent mean +/- standard deviation (SD) (* $p < 0.01$, one-way ANOVA test).

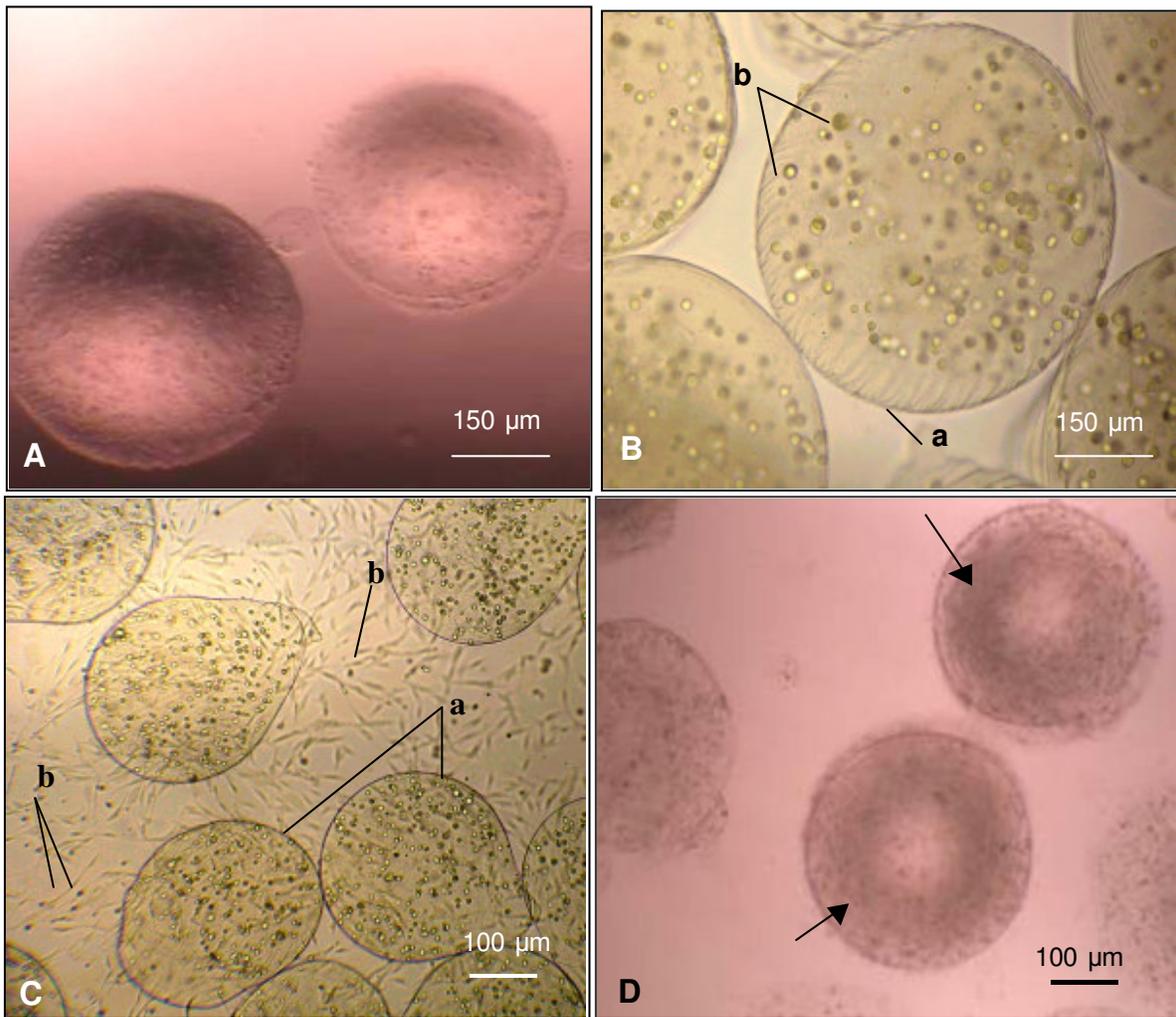


Figure 2. Encapsulated rBHK clones. A and B) rBHK cells one day after encapsulation - *a* indicates capsule's membrane of calcium alginate and *b* indicates the immobilized rBHK cells; C) Co-cultivation of encapsulated rBHK and MLD patient's fibroblasts - *a* indicates capsules and *b* indicates fibroblasts attached at the bottom of the plate; D) Cell growth inside capsules after 14 days of cultivation, arrows indicate the cell mass.

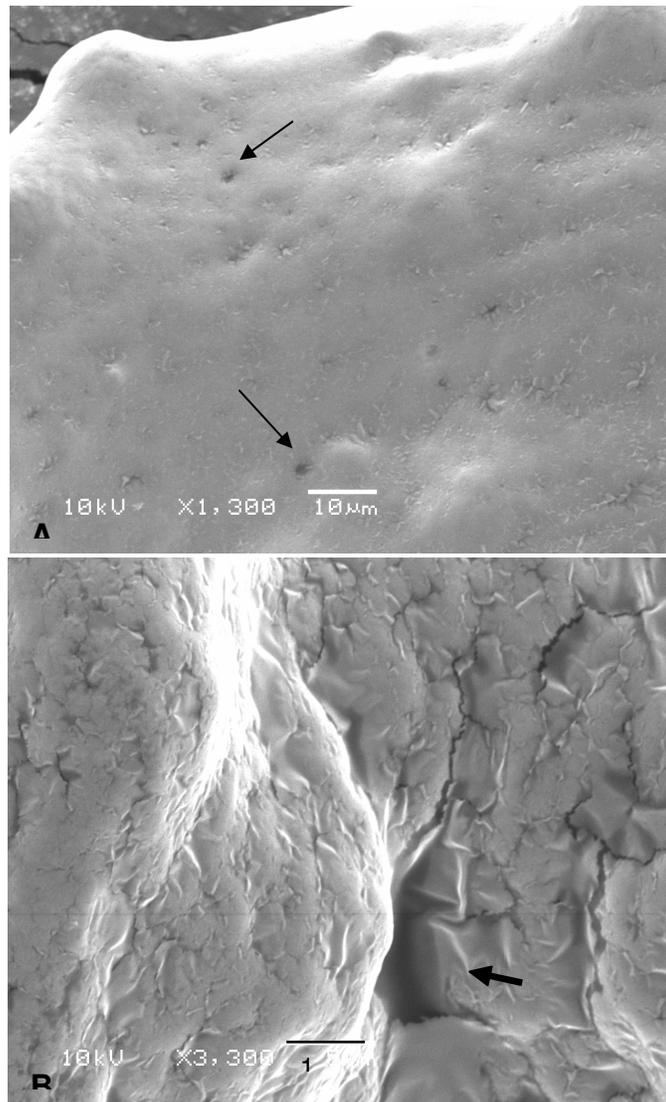


Figure 3. Scanning electron microscopy of encapsulated rBHK. Arrows indicate porous matrix. A) alginate capsule surface and B) interconnecting fissures in the surface morphology that confirmed a porous matrix of the capsules produced. Magnification: A- 1,300X and B- 3,300X.

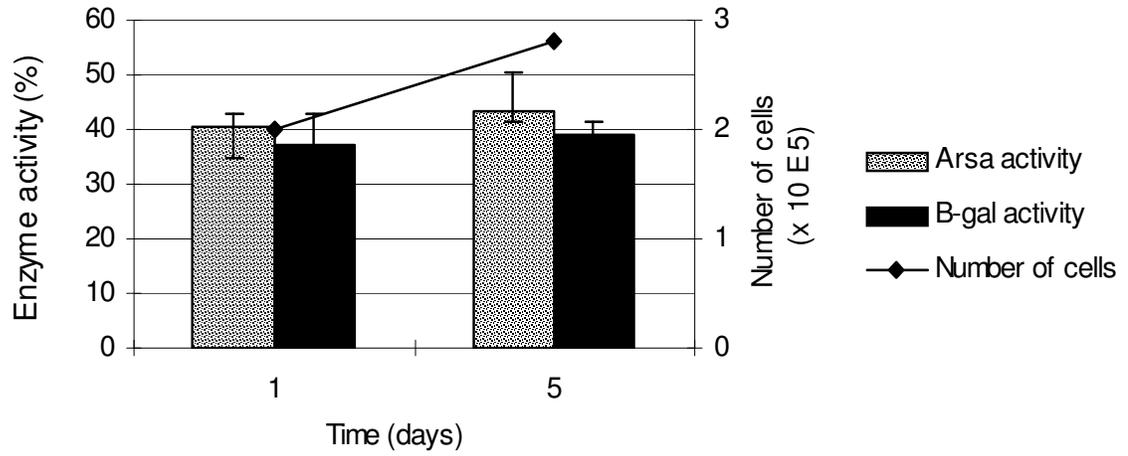


Figure 4. Cell number and percentage of ARSA and β -gal activities in the supernatant of encapsulated rBHK clones when compared to the supernatant of the same number of non-encapsulated rBHK clones.

Table 1. ARSA activity in MLD patient's fibroblasts, treated with encapsulated rBHK clones, supernatant of rBHK clones and empty capsules.

	CAPSULES	UPTAKE CONTROL	EMPTY
WEEK 1	3.25 +/-0.40 (n=6)	5.87 +/- 1.24 (n=6)	2.40 +/- 0.60 (n=3)
Week 2	5.60 +/- 0.86 (n=5)	8.72 +/- 1.32 (n=6)	3.08 +/- 0.42 (n=3)
Week 3	16.06 +/- 2.01 ^a (n=5)	18.26 +/- 1.84 ^a (n=6)	2.66 +/- 0.60 (n=3)
Week 4	23.42 +/- 6.39 ^a (n=5)	42.35 +/- 5.20 ^b (n=6)	2.71 +/- 0.34 (n=3)

Note: Values expressed in mean +/- SD (nmol/h/mg prot). *a* difference within the group among times and reference of MLD control (2.22 +/- 0.17, n=6), but not to normal control (23.9 +/- 2.01). *b* difference within of the group among times, MLD control and normal control . All other values are equal within the group among times, and to the MLD control, but different to normal control. One-Way ANOVA, post hoc Tukey, ($p < 0,01$).

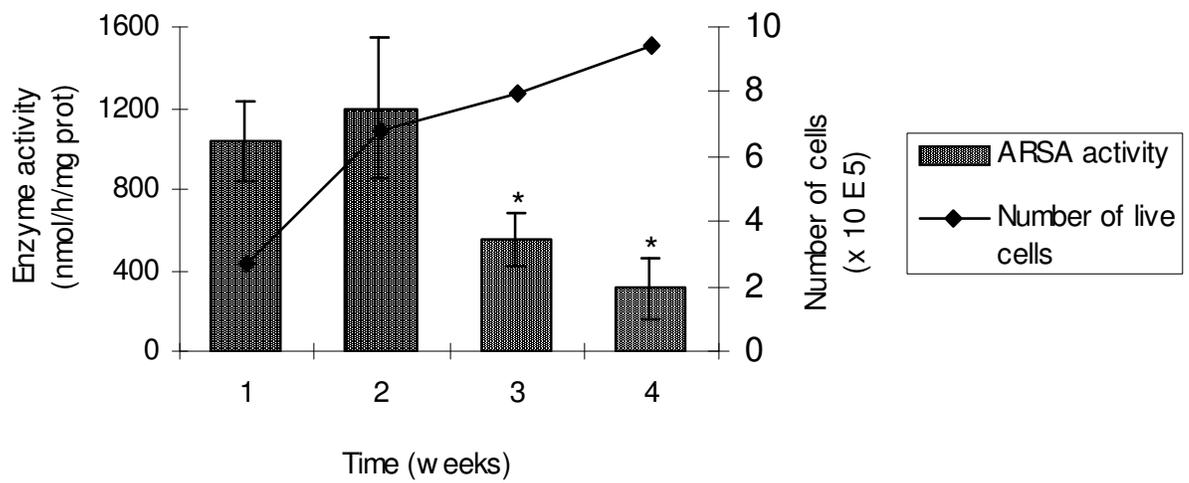


Figure 5. ARSA activity in encapsulated rBHK clones in the *CAPSULES* group and number of live cells during treatment. (* $p \leq 0.01$, between weeks 1 and 2, one-way ANOVA, *post hoc* Tukey test).

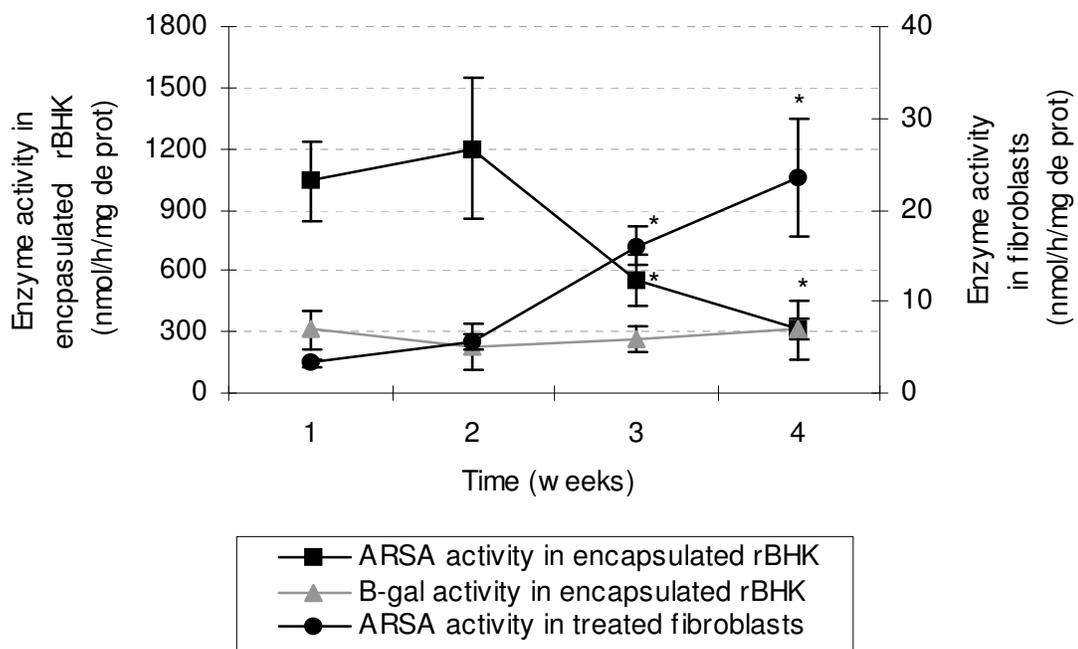


Figure 6. Enzyme activities in encapsulated rBHK and in treated MLD fibroblasts of the *CAPSULES* group. (*difference between weeks 1 and 2 compared to weeks 3 and 4 for rBHK and MLD fibroblasts. The figure does not show the comparison among groups, $p \leq 0.01$, one-way ANOVA, *post hoc* Tukey test).

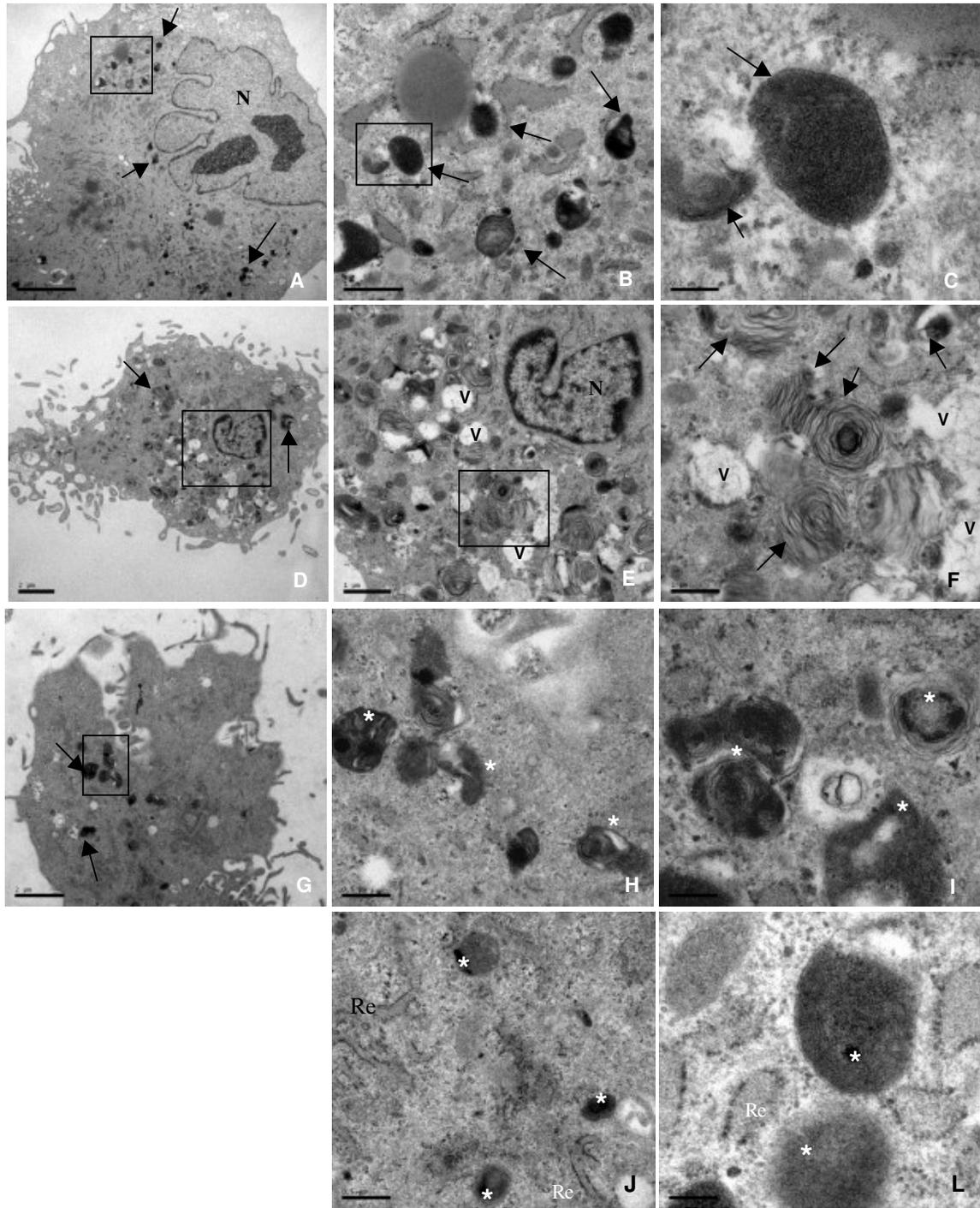


Figure 7. Reduction of sulfatide storage in MLD fibroblasts by ultrastructural analysis, after 3 weeks of treatment in *CAPSULES* and *UPTAKE CONTROL* groups. The demarcated regions in *A*, *B*, *D*, *E* and *G* are enlarged in the following image. *A*, *B*, *C*) normal fibroblast. *D*, *E*, *F*) MLD fibroblasts without treatment, showing abnormal inclusions and lamellated lysosomes (arrows). *G*, *H*, *I*) MLD fibroblasts treated with encapsulated rBHK clones and *J*, *L*) MLD fibroblasts treated with supplemented media from supernatant of non-encapsulated rBHK clones. Notice the changes in lysosome ultrastructure after treatment (*). Rough endoplasmic reticulum (Re); nucleus (N); vacuoles (v). Magnification: *A* X5,000; *D* X7,500; *G* X10,000; *E* X20,000; *B* X25,000; *H*, *J* X40,000; *F* X60,000; *I* X75,000 and *C*, *L* X100,000.

4. DISCUSSÃO

A Leucodistrofia Metacromática (LDM) é um erro inato do metabolismo que afeta primariamente o Sistema Nervoso Central (SNC). Entre as opções terapêuticas atuais, destaca-se o transplante de medula óssea. No entanto, a sua eficácia tem sido demonstrada somente em pacientes com alta atividade residual da enzima ou que estejam em um estágio pré-sintomático da doença (Shapiro *et al.*, 2005; Peters e Steward, 2003). Isto acontece provavelmente devido ao longo tempo requerido para que haja um grau de repovoamento da microglia no SNC suficiente para produzir os títulos enzimáticos necessários (Consiglio *et al.*, 2007). Porém, na maioria das vezes, o diagnóstico só é confirmado quando os sintomas já são evidentes, o que acaba dificultando esse tratamento. Assim sendo, duas alternativas são propostas para tentar reverter o quadro desta doença: a) aumentar a produção da enzima em células da medula e/ou células tronco hematopoiéticas a serem transplantadas, para diminuir a necessidade de um grande número de células a serem repostas, b) entregar a enzima diretamente no SNC.

No primeiro caso, uma opção seria a inserção do gene *ARSA* nas células a serem transplantadas. Entretanto estudos com cultura celular sugerem uma ineficiente fosforilação da *ARSA* pelo sistema hematopoiético, o que pode dificultar a captação da enzima pelas células vizinhas (Matzner *et al.*, 2005). Alternativamente, a administração direta de vetores virais dentro do SNC demonstrou melhora em camundongos modelo de LDM e MPS VII (Ohashi *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 1997; Bosh *et al.*, 2000; Consiglio *et al.*, 2001). Porém, a expressão transitória de vetores adeno-virais, a rota de administração, a limitada dispersão da enzima e os riscos de eventos de mutagênese insercional, limitam a eficácia deste tratamento. Sistemas não virais de entrega gênica também podem ser usados para expressar genes no cérebro de modelos animais, mas esta estratégia apresenta algumas limitações como, por exemplo, a dificuldade de transfecção dos certos tipos celulares do SNC (Leone *et al.*, 2000).

Neste estudo objetivamos avaliar a eficácia da combinação entre as terapias celular e gênica como opção terapêutica para LDM usando células BHK recombinantes (rBHK) encapsuladas. Baseado no fato de que as enzimas lisossômicas podem ser secretadas por células transfectadas e recaptadas por células não transfectadas, via receptor de manose 6- fosfato (M6PR), objetivamos desenvolver um tratamento alternativo para LDM que pudesse ultrapassar as dificuldades mencionadas anteriormente. Para isso, geramos células expressando elevadas quantidades de ARSA humana e testamos a eficácia desta enzima na reversão da deficiência de ARSA e do acúmulo de sulfatídeo em fibroblastos de pacientes com LDM. Optamos pela escolha da linhagem celular BHK para a inserção do transgene, uma vez que já foram realizados estudos sugerindo a eficiente fosforilação da ARSA humana por células BHK e CHO-K1 (Muschol *et al.*, 2002). A fosforilação é importante para a eficácia terapêutica pois a captação ocorre via receptor de M6P (Matzner *et al.*, 2001; Sands *et al.*, 2001).

A entrega do DNA às células alvo pode ser mediada por diferentes veículos como os vetores virais, polímeros, lipossomos e lipídeos catiônicos. Os métodos para uma eficiente transfecção do DNA devem levar em consideração a carga negativa presente na membrana celular, a estabilidade do DNA no citoplasma, o transporte deste ao núcleo e a expressão estável do transgene (Bally *et al.*, 1999).

Dois métodos não virais de transferência gênica foram avaliados em nosso estudo: lipo e polifecção. O uso de lipossomos é uma das estratégias propostas para facilitar a entrega do DNA (von Groll *et al.*, 2006). Embora o mecanismo inicialmente proposto por Felgner e colaboradores (1989) de que haveria uma fusão do lipoplexo com a membrana celular seguido da entrega do DNA ao citoplasma, vários estudos demonstram que a endocitose é o principal caminho pelo qual o DNA entra na célula quando está associado com lipossomos (Nakanish *et al.*, 2001). Já os políplexos catiônicos, como o polietilenoimino (PEI) são polímeros orgânicos que se complexam ao DNA, sendo capazes de adsorver prótons e iniciar um choque osmótico, desestabilizando o endossomo e assim protegendo o DNA da degradação, possibilitando alcançar altos níveis de eficiência na transferência gênica (Ernest *et al.*, 1999).

Nossos resultados demonstram que a lipofecção apresentou uma baixa expressão transitória de ARSA, enquanto a polifecção atingiu valores 30 vezes superior às células BHK não transfectadas, corroborando alguns trabalhos da literatura que demonstram alta eficiência na transfecção usando o PEI (Ernest *et al.*, 1999). Segundo Colosimo e colaboradores (2000) a expressão transitória do transgene pode ser detectada por 1 a 4 dias e o intervalo ótimo dependerá da linhagem celular usada, da cinética de crescimento e das características específicas da expressão para o gene transferido. Mesmo sem que ocorra a integração aos cromossomos, a presença de várias cópias do transgene ocasionará altos níveis de expressão protéica. Embora a expressão transitória usando o PEI tenha sido significativamente diferente à da lipofectamina, este método não permitiu a seleção de clones estáveis superexpressando ARSA. Cerca de 30 dias após a transfecção e seleção com o antibiótico Zeocina, somente as células transfectadas com lipofectamina apresentaram clones produzindo níveis elevados de ARSA.

O vetor de expressão usado (pTRACER-CMV2) possui o gene de resistência *Sh ble* para o antibiótico Zeocina e não apresenta a capacidade de se auto-replicar em células eucarióticas. Esta pode ser uma possível explicação para não termos obtido clones que superexpressassem ARSA na transferência gênica estável mediada por PEI. Poucos dias após a transfecção, o transgene pode ter sido degradado por nucleases ou então diluído por divisão celular, passando a níveis não detectáveis em pouco tempo, como já foi proposto por Molinas (2005). Portanto, uma vez que o nosso vetor enquadra-se dentro destas características, sendo que as células BHK, especialmente, apresentam alta taxa de proliferação e que a Zeocina pode levar de 2 a 6 semanas para uma completa seleção, acreditamos que isso tenha contribuído para o fracionamento do número de cópias plasmídeos por célula, resultando em um baixo nível de atividade enzimática nos clones ao longo do período.

Por outro lado, as células transfectadas com lipossomos mantiveram a expressão de ARSA durante todo o período em que foram mantidas com Zeocina. Para a expressão estável ser possível, o transgene deveria ser capaz de se replicar em sincronia com as células e para isso teria que possuir uma origem de replicação

em eucariotos ou se inserir ao genoma hospedeiro. Este último caso é justamente o que ocorre com o uso de certos vetores virais (Ziegler *et al.*, 2005; Griffey *et al.*, 2004). Além disso, a integração espontânea de plasmídeos no genoma hospedeiro pode ocorrer por recombinação, embora isto aconteça apenas em uma pequena fração de células transfectadas (The QIAGEN transfection resource book, QIAGEN, 1999). Baseado no fato de que a transfecção mediada por lipossomos se manteve elevada e estável, podemos sugerir que possa ter ocorrido a integração do pTARSA-CMV-2 ao genoma das células BHK, já que, segundo orientações do fabricante no catálogo do produto (Catálogo nº V885-01, V885-20, Version C 082901 - Invitrogen Life Technologies), a transfecção e a seleção de “integrantes estáveis” com o vetor foi otimizada para o uso de LipofectAmine 2000 e Zeocina, respectivamente. Embora a integração ao genoma explique os níveis enzimáticos ainda permanecerem elevados, seriam necessários estudos que para confirmar esta hipótese. Entre estes estudos, podemos citar a extração de DNA plasmídeo mantido episossomalmente nas células transfectadas, conforme descrito por Hirt (1967) e também pela técnica de LAM-PCR (*linear amplification-mediated PCR*), normalmente usada para detectar o local de inserção de um vetor retroviral dentro do DNA humano (Check *et al.*, 2002).

A expressão do cDNA de ARSA em células BHK tem o mesmo padrão que a ARSA sintetizada em fibroblastos humanos, incluindo suas formas glicosilada e deglicosilada (Stein *et al.*, 1989), além da eficiente fosforilação, já mencionada anteriormente. A expressão de ARSA no vetor pTARSA-CMV-2, pelas células BHK corrobora os resultados de Stein e colaboradores (1989), pois a enzima produzida demonstrou-se capaz de degradar o seu substrato artificial, em ensaios de atividade enzimática tanto no lisado celular quanto no sobrenadante dos clones (rBHK), demonstrando que a enzima é corretamente sintetizada e secretada por essas células.

A encapsulação celular foi realizada com o clone com maior valor de atividade enzimática de ARSA. As células imobilizadas em cápsulas de alginato mantêm sua viabilidade celular por um longo período, pois sua membrana semipermeável permite a entrada de nutrientes e saída dos produtos do seu metabolismo (Orive *et al.*, 2003c; Orive *et al.*, 2005). No entanto fatores como

tamanho, forma, o número de células e concentração de alginato, podem influenciar na otimização desta técnica tanto no que diz respeito à sua durabilidade quanto à sua estabilidade *in vitro* e *in vivo* (Orive *et al.*, 2003b; Zimmermann *et al.*, 2005; Orive *et al.*, 2006).

Visando encontrar as melhores condições para a manutenção das células encapsuladas, nós avaliamos previamente, a cinética de crescimento das células BHK encapsuladas em cultivo celular. Através da padronização da técnica de encapsulação, percebemos que uma velocidade de fluxo de ar superior a 6 L/min, produz cápsulas de menor tamanho, no entanto com irregularidades físicas como caudas, crateras e protuberâncias, conforme descrito por de Groot e colaboradores (2004). Essas irregularidades são áreas que favorecem o super crescimento das células, provocando pontos de necrose, devido ao grande número de células contidas num mesmo ponto e dificultando então a difusão dos nutrientes nesta área. Super-crescimento celular pode ser estabelecido dentro de poucas semanas após o cultivo ou transplante (de Vos *et al.*, 1999; Carlsson *et al.*, 2001). Se por um lado, cápsulas muito pequenas necessitam de um maior fluxo de ar, o que provoca deformações, cápsulas com tamanhos maiores também podem ser menos eficientes, uma vez que o raio da capsula é maior e, conseqüentemente, as células centrais podem sofrer necrose devido à falta de oxigenação e nutrientes em seu interior (Orive *et al.*, 2003c; Uludag *et al.*, 2000)

Neste trabalho, padronizamos a metodologia de encapsulação para células BHK comprando-as com uma linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) (dados em anexo). Os tamanhos obtidos foram os mesmos para os dois tipos celulares (em média 400 µm). As BHKs foram mantidas viáveis em cultura por cerca de 40 dias sem ser notada a presença de super-crescimento. O mesmo não aconteceu para as células HepG2, cujo super-crescimento foi detectado após 28 dias de cultivo e nas quais houve ainda o crescimento de células sob a porção pericapsular (dados em anexo). Isto nos auxilia na determinação do tempo em que cada linhagem poderá ser usada nos tratamentos com esta terapia, sem que ocorra o extravasamento de células para o meio externo.

Tendo sido padronizadas as melhores condições de encapsulação para as células BHK, nós avaliamos que a ARSA é liberada para o meio extracapsular e que neste meio a atividade enzimática se mantém em torno de 40% (+/- 2,62) dos valores encontrados no sobrenadante do mesmo número de células rBHK não encapsuladas. Como referência, utilizamos a medida de outra enzima, a β -gal, que também demonstrou uma média de atividade de 37% (+/- 5,8) dos valores observados em células não encapsuladas. Assim, percebemos que aproximadamente metade da enzima pode não ser liberada para o meio extracapsular ou então, pode sofrer alguma alteração que a torna inativa. De qualquer forma, no caso LDM, isto não representa um problema, pois se trata de uma doença autossômica recessiva, e portanto, indivíduos heterozigotos (que possuem aproximadamente 50% de atividade enzimática) são normais e a correção enzimática ocorrendo apenas a estes níveis já representa um grande avanço para o tratamento dessa desordem.

Após o tratamento dos fibroblastos com rBHK encapsuladas e com o meio suplementado com o sobrenadante das rBHKs, nossos resultados demonstram que a enzima produzida é captada pelos fibroblastos dos pacientes, corrigindo, *in vitro*, a deficiência nestas células. Nas primeiras semanas foi detectado um pequeno aumento na atividade de ARSA nos fibroblastos tratados. Após a terceira semana, os níveis de ARSA alcançaram valores significativos nos grupos *CAPSULES* e *UPTAKE CONTROL* quando comparados à média de atividade nos fibroblastos não tratados. Após a quarta semana os valores de atividade de ARSA demonstraram um aumento contínuo no grupo *CAPSULES* ($23,42 \pm 6,39$), mas no grupo *UPTAKE CONTROL* estes valores ultrapassaram os valores médios para fibroblastos normais ($23,9 \pm 2,01$), atingindo $42,35 \pm 5,20$ nmol/h/mg prot. ($p < 0,01$). Porém, embora esta diferença seja estatisticamente significativa, não apresenta relevância clínica pois o grupo ainda se mantém dentro dos valores de referência da enzima para a normalidade (que em fibroblastos é de 20 a 50 nmol/h/mg de proteína).

Esses resultados confirmam que o uso das cápsulas é uma boa estratégia para o tratamento dessa doença, pois além de corrigir a deficiência enzimática, não haveria a necessidade de reposição enzimática semanal, já que a enzima é

constantemente produzida pelas células que se mostraram viáveis *in vitro* por pelo menos quatro semanas.

Um ponto importante a ser abordado foram os níveis de ARSA medidos nas rBHKs encapsuladas usadas no tratamento do grupo *CAPSULES*. Após a terceira semana há uma redução na atividade de ARSA apenas nos clones encapsulados, para valores de aproximadamente 50% do obtido no início do tratamento. Se levarmos em consideração que a redução de ARSA nos clones encapsulados não se deve a morte celular, pois a viabilidade foi de 81% na quarta semana, e os níveis de β -gal nas mesmas amostras se mantiveram constantes, podemos sugerir a hipótese de silenciamento gênico. O promotor de CMV é um dos mais fortes promotores conhecidos até o momento (Nelson *et al.*, 1987; Andersson *et al.*, 1989; Molinas, 2005), resultando em altos níveis de expressão em uma ampla variedade de tipos celulares. No entanto, tem sido freqüentemente documentado que suas unidades de transcrição estáveis são silenciadas com o passar do tempo (Grassi *et al.*, 2003). A inativação deste promotor após transferência gênica já foi descrita *in vivo* em músculo e fígado de ratos e *in vitro* em linhagens celulares, estando associada à extensiva metilação (Teschendorf *et al.*, 2002; Maass *et al.*, 2003; Grassi *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2004). Esta hipótese justifica-se neste grupo uma vez que devido ao co-cultivo com os fibroblastos o meio não pode ser suplementado com Zeocina. Assim pode ter havido o silenciamento por não haver um força de seleção nestes clones rBHKs encapsulados. Já no grupo *UPTAKE CONTROL* não foi observado este silenciamento. Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta diferença: a manutenção do antibiótico de seleção e a encapsulação em si. As células rBHK não encapsuladas foram mantidas sobre seleção com zeocina por todo o período, exceto nas 24 horas em que era preparado o meio para suplementação dos fibroblastos. Isso poderia, de alguma forma influenciar na manutenção da expressão do plasmídeo. Estudos que confirmem o silenciamento deverão ser realizados como quantificação dos níveis de expressão de ARSA, através de Real Time PCR nas rBHKs encapsuladas, ao longo do período de tratamento, e estudos de reativação do

promotor CMV induzido por 5'-aza-2'-deoxicitidina (5'-AZA), um inibidor da metilação do DNA.

Analisando conjuntamente os dados da atividade enzimática nos fibroblastos tratados (tanto do grupo *CAPSULES* quanto do grupo *UPTAKE CONTROL*) e nas rBHKs encapsuladas (grupo *CAPSULES*) percebemos que nas duas primeiras semanas há um pico na atividade de ARSA nas rBHK encapsuladas e um decréscimo a partir da semana 3, que coincide com o aumento da atividade de ARSA nos fibroblastos. Estes dados sugerem que possa haver alguma alteração dos receptores de M6P. Estes receptores são responsáveis pela captação das hidrolases lisossômicas através do resíduo de manose 6 fosfato (figura 4).

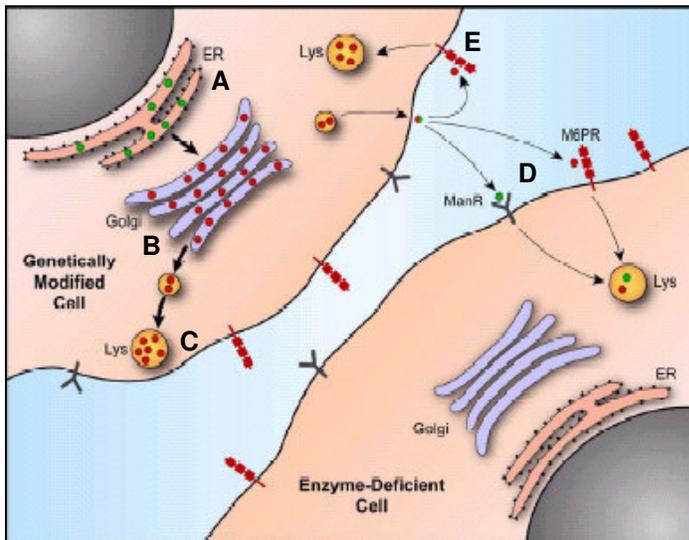


Figura 4. Tráfego de enzimas lisossômicas e correção cruzada. A enzima lisossômica nascente é glicosilada no retículo endoplasmático (RE) de células normais ou geneticamente modificadas (A). As enzimas são fosforiladas e adquirem o resíduo manose 6-fosfato (M6P) no aparato de Golgi (B) e então elas se ligam ao receptor de manose 6-fosfato (M6PR). A maioria das enzimas são transportadas para lisossomos maduros (Lys) (C). Uma parte, porém, pode ser secretada para o meio extracelular e enzimas fosforiladas ou não podem ligar-se aos receptores M6PR ou receptor de manose (ManR), respectivamente (D). Ambos mediam a endocitose e subsequente direcionamento para o

lisossoma. Este processo pode ocorrer tanto em células geneticamente modificadas quanto em células enzima-deficientes (E). É importante notar que M6PR é constantemente expresso, enquanto ManR é limitado a células do sistema reticuloendotelial. (Adaptado de Sands *et al.*, 2006)

Na terapia gênica para DLs, deve haver uma regulação dos níveis de expressão da enzima em questão. Mesmo que a estratégia se baseie na liberação enzimática e posterior captação desta por células deficientes, deve haver um balanço entre a superexpressão desejada para a secreção e a possibilidade de saturação dos receptores de M6P, o que pode resultar na redução da atividade de outras enzimas dependentes dessa via. Por esse motivo, vetores com altos níveis de expressão nem

sempre apresentam maior eficiência na correção do defeito enzimático (Anson *et al.*, 1992; Cheng & Smith, 2003).

Neste sentido, poderíamos pensar que o motivo pelo qual os fibroblastos tratados com as rBHK encapsuladas exibissem um aumento significativo de ARSA somente a partir da terceira semana, seria pelo fato de seus receptores M6P estarem saturados devido aos níveis elevados de ARSA presentes nas semanas iniciais reduzindo assim a entrada da enzima excedente na célula. Após duas semanas, com a diminuição dos níveis de enzima nas rBHKs encapsuladas devido, possivelmente, ao silenciamento gênico, a quantidade de enzima disponível no meio foi diminuída, permitindo uma melhor captação da enzima para as células.

Porém, no grupo utilizado como controle positivo (*UPTAKE CONTROL*), os níveis de atividade enzimática nos fibroblastos tratados apresentaram comportamento similar aos tratados com as cápsulas, ou seja, a atividade nos fibroblastos aumentou significativamente apenas a partir da terceira semana. Porém, conforme descrito anteriormente, os níveis de ARSA na rBHKs deste grupo se mantiveram constantes ao longo do tratamento, provavelmente pelo uso de Zeocina, que manteve o transgene ativo nestas células. Assim sendo, a hipótese de saturação dos receptores de M6P, torna-se inviável, já que neste grupo, os níveis da atividade de ARSA nas rBHKs foram constantes enquanto nos fibroblastos, aumentaram com o passar das semanas.

Capotondo e colaboradores (2007), geraram dois modelos para medir a consequência da superexpressão de ARSA, um modelo em células tronco hematopoiéticas e outro em modelo animal, usando em ambos a infecção celular com vetor lentiviral. Seus resultados apontam que níveis elevados da enzima não leva à ocorrência do fenômeno de saturação, não prejudica a ativação de outras sulfatases e não influencia na proliferação clonal e diferenciação em multi-linhagens das células tronco hematopoiéticas, sendo portanto, considerada segura para uso em terapia gênica.

Em vista disso, podemos sugerir que possa ter havido um aumento na expressão dos receptores M6P, devido a uma elevada disponibilidade de ARSA no meio. Isto explicaria o comportamento dos fibroblastos nos dois grupos. Uma vez que

há disponibilidade de grandes quantidades de ARSA no meio, as células deficientes começam a captar esta enzima e induzir a expressão de novos receptores de M6P. Com o tempo, novos receptores estão disponíveis e, portanto, capazes de captar maior quantidade de enzima, levando a um aumento de atividade enzimática dentro dos fibroblastos tratados. A partir disso podemos explicar também o fato dos níveis de β -gal nos fibroblastos tratados com as cápsulas aumentarem de $373,63 \pm 59,08$ nmol/h/mg prot (sem tratamento) para $561,36 \pm 80,80$ nmol/h/mg prot, após a quarta semana (*One Way-ANOVA*, $p < 0,05$). Mesmo que clinicamente este aumento não seja relevante, pois estes valores encontram-se dentro faixa de normalidade para a enzima β -gal (de 395 a 1440 nmol/h/mg prot), este aumento pode ser considerado como uma evidência de que está havendo maior captação enzimática devido à superexpressão dos receptores.

Porém, para confirmarmos esses achados, novos estudos deverão ser realizados. A avaliação dos níveis de expressão do M6PR por PCR quantitativo (qPCR) comprovará ou não a superexpressão deste receptor. Ensaios de inibição da captação e dosagem de ARSA no sobrenadante dos tratamentos auxiliarão no descarte da hipótese de saturação dos receptores de M6P, e, além disso, um tempo maior de tratamento deverá ser analisado, para verificarmos se há ou não estabilização nos níveis de ARSA tanto nas rBHKs encapsuladas quanto nos fibroblastos.

Consiglio e colaboradores (2007), propuseram um protocolo semelhante para LDM usando células encapsuladas. Mioblastos de camundongos C_2C_{12} foram transduzidos com um vetor retroviral contendo o cDNA humano de ARSA. Após infecção, as células apresentaram um aumento de 15 e 5 vezes na atividade intracelular e secreção de ARSA, respectivamente. As células foram encapsuladas em fibras de poliéter-sulfona (PES) e o meio destas células encapsuladas foi coletado e usado para tratar oligodendrócitos (OL) derivados do modelo animal de LDM (camundongo *knock-out*). A captação de ARSA alcançada pelos OLs medida por teste de sobrecarga de sulfatídeos, foi de 80% dos níveis fisiológicos e o tratamento mostrou-se capaz de restabelecer o metabolismo normal de sulfatídeos.

Contudo, o principal teste para avaliar a eficácia do tratamento é demonstrar a reversão do acúmulo de sulfatídeos. Em cultura de células o acúmulo de sulfatídeos pode ser demonstrado por cromatografia em camada delgada, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (Klein *et al.*, 2005). Para a cromatografia há necessidade de se realizar uma sobrecarga com sulfatídeo marcado, para que as células retenham o substrato e este possa ser detectado, caso não degradado, na cromatografia. Para a imunofluorescência é necessária a utilização de anticorpos contra o sulfatídeo para que se possa verificar sua quantidade e localização na célula. A microscopia eletrônica demonstra a morfologia típica deste material em formas lamelares, muitas vezes lembrando as camadas de uma cebola (*onion-like storage material*) (Klein *et al.*, 2005).

Em nosso estudo utilizamos a análise ultra-estrutural para detectar o acúmulo de sulfatídeos. Os fibroblastos não tratados apresentaram uma quantidade superior de vacúolos (alguns com grânulos reticulados) em relação ao controle normal e aos tratados. Esses achados corroboram os já descritos na literatura para fibroblastos e outros tipos celulares (Kamensky *et al.*, 1973; Schott *et al.*, 2001; Wittke *et al.*, 2004; Saravanan *et al.*, 2006). Além disso, estas células apresentaram lisossomos com inclusões lamelares muito similares às características ultra-estruturais encontradas nas células de Schwann (Saravanan *et al.*, 2006). Após o tratamento com as células rBHKs encapsuladas ou com sobrenadante das não encapsuladas, os dois grupos apresentaram uma discreta diminuição no volume do material estocado dentro do lisossomo, bem como uma alteração na morfologia deste material. Em algumas células as inclusões lamelares parecem diminuir, o que sugere uma redução no acúmulo do estoque lisossomal devido a um aumento da captação da ARSA recombinante expressa pelas células usadas nos tratamentos. No entanto, estas estruturas foram algumas vezes encontradas também em células do controle normal. Embora estes tipos de inclusões já tenham sido descritos em fibroblastos normais (Kamensky *et al.*, 1973), nós verificamos que nestes, o material lisossomal apresentou-se mais homogêneo. Isto nos serve como indicativo de que a ARSA superexpressa foi capaz de ser captada e degradar o seu substrato natural,

levando a uma diminuição do acúmulo lisossomal e possivelmente auxiliando na correção do dano metabólico desta doença.

Vários outros estudos mostraram a habilidade de células encapsuladas para liberação de proteínas de interesse. Implantes intraventriculares foram aplicados com sucesso no tratamento do modelo experimental de MPS VII (Ross *et al.*, 2000) e recentemente o implante intraperitoneal de mioblastos encapsulados superexpressando a enzima iduronato sulfatase, demonstrou resultados benéficos no modelo animal de MPS II, reduzindo o acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) (Friso *et al.*, 2005). As células encapsuladas também são usadas para a entrega de fatores neurotróficos, visando à proteção da neurodegeneração em doença de Parkinson (Lindvall & Wahlberg, 2007). Para a doença de Huntington um protocolo de fase I foi concluído. Neste estudo, Bloch e colaboradores (2004), avaliaram a segurança da administração intracerebral usando uma cápsula com membrana semipermeável contendo células BHK recombinantes superexpressando o fator neurotrófico ciliar CNTF (*ciliary neurotrophic factor*). Seis pacientes tiveram uma cápsula implantada dentro do ventrículo lateral direito. A cápsula era retirada e trocada por outra nova a cada 6 meses, por um período de 2 anos. Nenhum sinal de toxicidade induzida por CNTF foi observado. Todas as cápsulas retiradas estavam intactas, mas continham um número variável de células viáveis. Foram observadas melhoras nos resultados eletrofisiológicos foram observados e se correlacionaram com a quantidade de CNTF liberada pelas células encapsuladas, sem oferecer riscos aos pacientes.

Em conclusão, nossos resultados, somados aos existentes na literatura, indicam que a estratégia de entrega de produtos terapêuticos através de células encapsuladas apresenta um alto potencial terapêutico, encorajando novos estudos nesta área. Embora estudos pré-clínicos com TRE em modelo animal de LDM tenham demonstrado efeitos terapêuticos significantes com a administração semanal de ARSA, as deficiências desta estratégia são evidentes, por se tratar de uma doença de SNC. O implante de cápsulas dentro do cérebro poderia ser uma estratégia combinada com a TRE, dessa forma as cápsulas confeririam a entrega localizada da enzima no SNC e isso poderia maximizar os efeitos terapêuticos na

doença, além de possivelmente diminuir a frequência das aplicações de TRE. Isto demonstra que o tratamento *in vitro* com células encapsuladas poderá auxiliar no tratamento desta doença. Entretanto, ainda são necessários estudos no modelo animal de ARSA que corroborem os resultados obtidos neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

A construção do vetor carregando o cDNA da ARSA foi efetuada com sucesso e a transfecção com este vetor de expressão em células BHK permitiu a seleção de um clone superexpressando a enzima.

A encapsulação de células rBHK em microcápsulas de alginato de sódio foi padronizada, caracterizando-se sua estabilidade e cinética de crescimento *in vitro*.

As cápsulas foram co-cultivadas com os fibroblastos de pacientes com LDM. Além disso, foi feito um grupo controle utilizando apenas o sobrenadante das células rBHK não encapsuladas.

A enzima produzida pelas células rBHK, encapsuladas ou não, foi captada pelos fibroblastos derivados de pacientes com LDM, corrigindo a sua deficiência *in vitro*. Além disso, foi observada uma redução no acúmulo de sulfatídeos dentro dos lisossomos, avaliada por microscopia eletrônica de transmissão.

6. REFERÊNCIAS

Altarescu G, Hill S, Wiggs E, Jeffries N, Kreps C, Parker CC, Brady RO, Barton NW and Schiffmann R (2001) The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease. *J Pediatr* 138:539-47.

Andersson S, Davis DL, Dahlbäck H, Jörnvall H and Russell DW (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264:8222-8229.

Anson DS, Bielicki J and Hopwood JJ (1992) Correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by retroviral-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase gene. *Hum Gene Ther* 3(4):371-9.

Araujo APQC (2004) Psychiatric features of metabolic disorders. *Rev Psiquiatr Clin* 31: 285-9.

Arvanitis D, Dumas M and Szuchet S (1992) Myelin paligenesis: Immunocytochemical localization of myelin/oligodendrocyte glycolipids in multilamellar structures. *Dev Neurosci* 14:328-335.

Bally MB, Harvie P, Wong FM, Kong S, Wasan EK and Reimer DL (1999) Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 38(3):291-315.

Balslev T, Crtez MA, Blaser SI and Haslam RH (1997) Recurrent seizures in metachromatic leukodystrophy. *Pediatr Neurol* 17:150-154.

Baum H, Dodgson KS and Spenger B (1959) The assay of arylsulphatase A and B in urine. *Clinica Chimica Acta* 4:453-455.

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P and Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15(10):968-75.

Bosch A, Perret E, Desmaris N and Heard JM (2000) Long-term and significant correction of brain lesions in adult mucopolysaccharidosis type VII mice using recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 1:63-70.

Bosio A, Binczek E and Stoffel W (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13280-13285.

Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P and Rubanyi GM (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6(4):395-404.

Burk R, Valle D, Thomas G, Moser A, Moser H, Rosenbaum K and Schmid K (1981) Multiple sulfatase deficiency (MSD): clinical and biochemical studies in two patients. *Am J Hum Genet* 33:73A.

Burk RD, Valle D, Thomas GH, Miller C, Moser A, Moser H and Rosenbaum KN (1984) Early manifestations of multiple sulfatase deficiency. *J Pediatr* 104: 574-578.

Capotondo A, Cesani M, Pepe S, Fasano S, Gregori S, Tononi L, Venneri MA, Brambilla R, Quattrini A, Ballabio A, Cosma MP, Naldini L and Biffi A (2007) Safety of arylsulfatase A overexpression for gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Hum Gene Ther* 18:821-36.

Carlsson PO, Palm F, Andersson A and Liss P (2001) Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes* 50:489-95.

Chabás A, Castellvi S, Bayés M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu L, Marfany G, Lissens W and González-Duarte R (1993) Frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele in the Spanish population. *Clin Genet* 44:320-323.

Chang PL, Van Raamsdonk JM, Hortelano G, Barsoum SC, MacDonald NC and Stockley TL (1999) The in vivo delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. *Trends Biotechnol* 17:78-83.

Chang TM (1964) Semipermeable microcapsules. *Science* 146:524-5.

Check E (2002) Gene Therapy: a tragic setback. *Nature* 420:116-118.

Cheng SH and Smith AE (2003) Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther* 10(16):1275-81.

Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ and Gruenert DC (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29:314-331.

Consiglio A, Martino S, Dolcetta D, Cusella G, Conese M, Marchesini S, Benaglia G, Wrabetz L, Orlacchio A, Déglon N, Aebischer P, Severini GM and Bordignon C (2007) Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J Neurol Sci* 255:7-16.

Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, Marchesini S, Cestari V, Oliverio A, Bordignon C and Naldini L (2001) In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of

neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med* 7:310-6.

De Groot M, Schuurs TA and van Schilfgaarde R (2004) Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* 121:141-50.

De Vos P, Van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, de Groot M, Ploeg RJ, De Haan BJ and Van Schilfgaarde R (1999) Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes* 48:1381-8.

Desnick RJ and Schuchman EH (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet* 3:954-66.

Dierks T, Schmidt B and von Figura K (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11963-11968.

Emerich DF, Lindner MD, Winn SR, Chen EY, Frydel BR and Kordower JH (1996) Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* 16:5168-81.

Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE and Kordower JH (1997) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386:395-9.

Ernst N, Ulrichskötter S, Schmalix WA, Rädler J, Galneder R, Mayer E, Gersting S, Plank C, Reinhardt D and Rosenecker J (1999) Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J Gene Med* 1:331-40.

Felgner PL and Ringold GM (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337:387-8.

Friso A, Tomanin R, Alba S, Gasparotto N, Puicher EP, Fusco M, Hortelano G, Muenzer J, Marin O, Zacchello F and Scarpa M (2005) Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *J Gene Med* 7:1482-91.

Gieselmann V (2007) Metachromatic leukodystrophy. In: Baranger J and Cabrerazalazar MA (orgs) *Lysosomal Storage Disorders*, pp 285-306.

Gieselmann V, Polten A, Kreysing J and von Figura K (1989) Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 9436-9440.

Gieselmann V, Polten A, Kreysing J and von Figura K (1994) Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *J Inher Metab Dis* 17: 500-509.

Gimenez-Sanches G, Childs B and Valle D (2001) The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver CH, Beaudet *al*, Sly WS, and Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edition. New York: McGraw-Hill, pp 67-174.

Giugliani R, Coelho JC, Vargas C, Burin M and Wajner M (1999) Defeitos genéticos do metabolismo. In: Sacchet AMOF (eds) *Genética para que te quero?*. Porto Alegre: Editora da Universidade, pp 213-223.

Grassi G, Maccaroni P, Meyer R, Kaiser H, D'Ambrosio E, Pascale E, Grassi M, Kuhn A, Di Nardo P, Kandolf R and Küpper JH (2003) Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 24(10):1625-35.

Griffey M, Bible E, Vogler C, Levy B, Gupta P, Cooper J and Sands MS (2004) Adeno-associated virus 2-mediated gene therapy decreases autofluorescent storage material and increases brain mass in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 16(2):360-9.

Hauser G (1964) Labeling of cerebroside and sulfatides in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 84:212-5.

Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, Von Figura K, D'hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C and Gieselmann V (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93:14821-14826.

Hirt B (1967) Selective extracion of Polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26,365-369.

Hoffman D, Breakefield XO, Short MP and Aebischer P (1993) Transplantation of a polymer-encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp Neurol* 122:100-6.

Hohenschutz C, Eich P, Friedl W, Waheed A, Conzelmann E and Propping P (1989) Pseudodeficiency of arylsulphatase A: a common genetic polymorphism with possible disease implications. *Human Genetic* 82:45-8.

Kakkis ED, Schuchman E, He X, Wan Q, Kania S, Wiemelt S, Hasson CW, O'Malley T, Weil MA, Aguirre GA, Brown DE and Haskins ME (2001) Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 72:199-208.

Kamensky E, Philippart M, Cancilla P and Frommes SP (1973) Cultured skin fibroblasts in storage disorders. An analysis of ultrastructural features. *Am J Pathol* 73(1):59-80

Kawabata K, Migita M, Mochizuki H, Miyake K, Igarashi T, Fukunaga Y and Shimada T (2006) Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Research* 1094:13-23.

Klein D, Büssow H, Fewou SN and Gieselmann V (2005) Exocytosis of storage material in a lysosomal disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 18;327(3):663-7.

Kreysing J, Bohne W, Bösenberg C, Marchesini S, Turpin JC, Baumann N, von Figura K and Gieselmann V (1993) High residual arylsulfatase A (ARSA) activity in a patient with late-infantile metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 53:339-46.

Kreysing J, von Figura K and Gieselmann V (1990) The structure of arylsulfatase A gene. *Eur J Biochem* 191:627-631.

Krivit W, Aubourg P, Shapiro E and Peters C (1999) Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol* 6:377-382.

Krivit W, Shapiro E, Kennedy W, Lipton M, Lockman L, Smith S, Summers CG, Wenger DA, Tsai MY, Ramsay NK, Kersey JH, Yao JK and Kaye E (1990) Treatment of late infantile metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 322:28-32.

Kuijlen JM, de Haan BJ, Helfrich W, de Boer JF, Samplonius D, Mooij JJ and deVos P (2006) The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors. *J Neurooncol* 78:31-9.

Kurai T and Shimada T (2007) Recombinant adeno-associated virus-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Nippon Med Sch* 74:188-9.

Kurai T, Hisayasu S, Kitagawa R, Migita M, Suzuki H, Hirai Y and Shimada T (2007) AAV1 Mediate Co-expression of Formylglycine-Generating Enzyme and Arylsulfatase A Efficiently Corrects Sulfatide Storage in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Molecular therapy* 15:38-43.

Laidler MP, Waheed A and van Etten LR (1985) Structural and immunochemical characterization of human urine arylsulfatase A purified by affinity chromatography. *Biochem Biophys Acta* 827: 73-83.

Lee-Vaupel M and Conzelmann E (1987) A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin Chim Acta* 164: 171-180.

Leone P, Janson CG, Bilaniuk L, Wang Z, Sorgi F, Huang L, Matalon R, Kaul R, Zeng Z, Freese A, McPhee SW, Mee E and During MJ (2000) Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease. *Ann Neurol* 48:27-38.

Life Technologies (1999) Guide to eukaryotic transfections with cationic lipid reagents.

Lindvall O and Wahlberg LU (2008) Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol* 209:82-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

Luca T, Givogri M, Perani L, Galbiati F, Follenzi A, Naldini L and Bongarzone E (2005) Axons mediate the distribution of arylsulfatase a within the mouse hippocampus upon gene delivery. *Molecular Therapy* 12: 669-679.

Maass A, Langer SJ, Oberdorf-Maass S, Bauer S, Neyses L, and Leinwand LA (2003) Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 35(7):823-31.

Mabe-Santana P (2006) La enfermedad de Krabbe y la leucodistrofia metacromática. In: Sanjurjo P and Baldellou A (eds) *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Editora Ergon, pp 639-650.

Malm G, Ringdén O, Winiarski J, Gröndahl E, Uyebrant P, Eriksson U, Håkansson H, Skjeldal O and Månsson JE (1996) Clinical outcome in four children with metachromatic leukodystrophy treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17:1003-1008.

Marcus J, Honigbaum S, Shroff S, Honke K, Rosenbluth J and Dupree JL. (2006) Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia* 53:372-381.

Martin PL, Carter SL, Kernan NA, Sahdev I, Wall D, Pietryga D, Wagner JE and Kurtzberg J (2006) Results of the cord blood transplantation study (COBLT): outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:184-194.

Martino S, Consigkio A, Cavalieri C, Tiribuzi R, Costanzi E, Severini GM, Emiliani C, Bordignon C and Orlicchio A (2005) Expression and purification of a human, soluble Arylsulfatase A for Metachromatic Leukodystrophy enzyme replacement therapy. *J of Biotechnology* 117: 243-251.

Martins AM (2003) Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica, 2nd edition. São Paulo.

Matzner U and Gieselmann V (2005) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Expert Opin Biol Ther* 5:55-65.

Matzner U, Harzer K, Learish RD, Barranger JA and Gieselmann V (2000) Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Ther* 7:1250-1257.

Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J and Gieselmann V (2005) Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum Mol Genet* 14:1139-52.

Matzner U, Schestag F, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, D'Hooge R, De Deyn PP and Gieselmann V (2001) Bone marrow stem cell gene therapy of arylsulfatase A-deficient mice, using an arylsulfatase A mutant that is hypersecreted from retrovirally transduced donor-type cells. *Hum Gene Ther* 12:1021-33.

Molinas MMB (2005) Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension: Process Characterization and Optimization by Applying Invasive Nucleotide and Non-invasive Electronic Nose Technology. Doctoral Thesis.

Muschol N, Matzner U, Tiede S, Gieselmann V, Ullrich K and Bräulke T (2002) Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochem J* 368:845-53.

Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M, Okuyama T and Sakuragawa N (2006) Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med* 209:23-32.

Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(3):233-44.

Nardi NB, Teixeira LAK and Silva EFA (2002) Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva* 7: 109-116.

Nelson JA, Reynolds-Kohler C and Smith BA (1987) Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 7: 4125-4129.

Nelson PV, Carey WF and Morris CP (1991) Population frequency of the arylsulphatase A pseudo-deficiency allele. *Hum Genet* 87:87-88.

Ohashi T, Watabe K, Uehara K, Sly WS, Vogler C and Eto Y (1997) Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human beta-glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1287-92.

Orive G, Carcaboso AM, Hernández RM, Gascón AR and Pedraz JL (2005) Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules* 6(2):927-31.

Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M and Pedraz JL (2003c) Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends in Pharm Sci* 24(5):207-10.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M and Pedraz JL (2003a) Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. *Int J Pharm* 259:57-68.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M and Pedraz JL (2003b) Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci* 1:23-30.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Rojas A and Pedraz JL (2001) Microencapsulation of an anti-VE cadherin antibody secreting IB5 hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng* 76: 285-94.

Orive G, Ponce S, Ández AR, Gascón M, Igartua JL and Pedraz JL (2002) Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 23:3825-3831.

Orive G, Tam SK, Pedraz JL and Hallé JP (2006) Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials*. 27(20):3691-700.

Passini MA and Wolfe JH (2001) Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector. *J Virol* 75:12382-92.

Passini MA, Macauley SL, Huff MR, Taksir TV, Bu J, Wu IH, Piepenhagen PA, Dodge JC, Shihabuddin LS, O'Riordan CR, Schuchman EH and Stewart GR (2005) AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *Mol Ther* 11:754-62.

Pedron CG, Gaspar PA, Giugliani R and Pereira ML (1999) Arylsulfatase A pseudodeficiency in healthy Brazilian individuals. *Braz J Med Biol Res* 32: 941-945.

Pereira MLS (1994) Molecular and biochemical characterization of defects in the arylsulphatase A gene. Division of Medical and Molecular Genetics. United Medical and Dental Schools of Guy's and St Thomas' Hospital. Tese de doutorado, Universidade de Londres, Londres.

Pérez-Calvo J, Giraldo P, Pastores GM, Fernández-Galán M, Martín-Nuñez G and Pocoví M (2003) Extended interval between enzyme therapy infusions for adult patients with Gaucher's disease type 1. *J Postgrad Med* 49:127-31.

Peters C and Steward CG (2003) Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 31:229-39.

Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, Von Figura K and Gieselmann V (1991) Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *The New England journal of medicine* 324:18-22.

QIAGEN (1999) *The QIAGEN transfection resource book*.

Ross CJ, Ralph M and Chang PL (1999) Delivery of recombinant gene products to the central nervous system with nonautologous cells in alginate microcapsules. *Hum Gene Ther* 10:49-59.

Ross CJ, Ralph M and Chang PL (2000) Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells. *Exp Neurol* 166:276-86.

Sainz CM, Muñoz CZ and Monteagudo AGQ (2002) Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. *Rev Cubana Pediatr* 74: 68-76.

Sands MS, Vogler CA, Ohlemiller KK, Roberts MS, Grubb JH, Levy B and Sly WS (2001) Biodistribution, kinetics, and efficacy of highly phosphorylated and non-phosphorylated beta-glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII. *J Biol Chem* 276:43160-5.

Sanseverino MTV, Kessler RG, Burin MG, Herman RF, Matte U, Barrios PMM and Magalhães JA (2001) Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. *Revista HCPA* 3:301-316.

Saravanan K, Büssow H, Weiler N, Gieselmann V and Franken S (2007) Spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *Neurosci Methods* 161(2):223-33.

Saudubray JM and Charpentier C (1995) Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS and Valle D. *The metabolic and molecular bases of Inherited Disease*. 7th edition. New York: McGraw-Hill Inc, pp 327-400.

Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A and von Figura K (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82:271-278.

Schott I, Hartmann D, Gieselmann V and Lüllmann-Rauch R (2001) Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice. *Virchows Arch* 439(1):90-6.

Sevin C, Aubourg P and Cartier N (2007) Enzyme, cell and gene-based therapies for metachromatic leukodystrophy. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30:175-183.

Sevin C, Benraiss A, Vam Dam D, Bonnim D, Nagels G, Verot L, Laurendeau I, Vidaud M, Gieselmann V, Vanier M, Deyn P, Aubourg P and Cartier N (2006) Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy. *Human Mol Genetics* 15:53-64.

Shapira E and Nadler HL (1975) Problems associated with the determination of arylsulfatase A and B using nitrocatechol sulfate substrate. *Clinica Chimica Acta* 65:1-4.

Shapiro EG, Lockman LA, Balthazor M and Krivit W (2005) Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation. *J Inher Metab Dis* 18:413-29.

Shapiro LJ, Aleck KA, Kaback MM, Itabashi H, Desnick RJ, Brand N, Stevens RL, Fluharty AL and Kihara H (1979) Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency. *Pediatr Res* 13:1179-1181.

Souza ICN (2002) Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. Escola Paulista de Medicina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schimidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS and Von Figura K (1989) Cloning and expression of human arylsulfatase A. *The journal of biological chemistry* 264:1252-1259.

Suzuki K (1977) Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease) and GM1 gangliosidosis. In: Glew RH and Petersen SP (eds) *Practical enzymology of the sphingolipidosis*. New York, Alan R Liss.

Teschendorf C, Warrington KH Jr, Siemann DW and Muzyczka N (2002) Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res* 22(6A):3325-30.

Tseng JL, Baetge EE, Zurn AD and Aebischer P (1997) GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J Neurosci* 17:325-33.

Uludag H, Vos P and Tresco P (2000) Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 42:29-64.

Visted T, Bjerkvig R and Enger PO (2001) Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro Oncol* 3:201-10.

Von Figura K, Gieselmann V and Jaeken J (2001) Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet *al*, Sly WS, and Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition. New York: McGraw–Hill, pp 3695-3724.

von Groll A, Levin Y, Barbosa MC and Ravazzolo AP (2006) Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog* 22:1220-4.

Waheed A, Hasilik A and von Figura K (1982) Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 363:425-430.

Wilcox WR (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *The journal of Pediatrics* 144:3-14.

Wittke D, Hartmann D, Gieselmann V and Lüllmann-Rauch R (2004) Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol* 108(4):261-71.

Wraith JE (2001) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I: progress and emerging difficulties. *J Inherit Metab Dis* 24:245-50.

Wraith JE (2002) Lysosomal disorders. *Semin Neonatol*. 2002 Feb;7(1):75-83.

Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T and Ohmoto T (1999) Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells. *Cell Transplant* 8:427-30.

Zeng Y, Cheng H, Jiang X and Han X (2008) Endosomes and lysosomes play distinct roles in sulfatide-induced neuroblastoma apoptosis: potential mechanisms contributing to abnormal sulfatide metabolism in related neuronal diseases. *Biochem J* 410:81-92.

Zhang Y, Wang W, Zhou J, Yu W, Zhang X, Guo X and Ma X (2007) Transplantation of a polymer-encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp Neurol* 122:100-6.

Ziegler C, Just FT, Lischewski A, Elbers K and Neubauer A (2005) A glycoprotein M-deleted equid herpesvirus 4 is severely impaired in virus egress and cell-to-cell spread. *J Gen Virol*. 86(1):11-21

Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, Weber M, Ihmig FR, Ehrhart F, Gessner P, Behringer M, Steinbach A, Wegner LH, Sukhorukov VL, Vásquez JA, Schneider S, Weber MM, Volke F, Wolf R and Zimmermann U

(2005) Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* 16:491-501.

7. ANEXOS

7.1 PROTOCOLOS LABORATORIAIS

7.1.1 Clonagem Molecular

I. Transformação de células competentes por choque térmico

- Remover do -80°C, uma alíquota de 50 µL de células termocompetentes (DH5α - Invitrogen), e descongelá-las em gelo.
- Acrescentar 1-3 µL do DNA em 50 µL de células competentes.
- Incubar a mistura no gelo por 30 minutos.
- Deixar em banho-maria a 42°C por 45 segundos.
- Incubar no gelo por mais 2 minutos.
- Acrescentar 550-950 µL de meio SOC (pode ser substituído por meio LB ou qualquer meio de crescimento para *E. coli*).
- Incubar a 37°C em *shaker*, a 180 rpm por pelo menos 1 h.
- Plaquear 200-300 µL do produto transformado, em placa de Petry contendo 20 mL de meio LB sólido acrescido de 20 µL de ampicilina (100mg/mL) e incubar em estufa a 37°C por 16h.

II. Extração do DNA plasmideal com “Kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification” (Invitrogen)

- Inocular células de uma colônia bacteriana crescida na placa, em 300-400 mL de meio LB líquido contendo 300-400 µL de ampicilina (100mg/mL) e incubar a 37°C em *shaker*, a 180 rpm por 16h.
- Para plasmídeos de alto número de cópias, usar 300-400 mL de meio de cultura LB. Já para plasmídeos de baixo número de cópias, usar 400-600 mL de meio.
- Centrifugar o meio de cultura LB com as células a 6000 rpm por 10 minutos, divididos em tubos tipo Falcon, de 50 mL.
- Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender o *pellet* em 10mL de tampão de ressuspensão (R3) cotendo RNase A.

- Adicionar 10mL de tampão de Lise (L7).
- Misturar gentilmente, por inversão, 5-10 vezes.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Adicionar 10mL do tampão de precipitação (N3) e misturar imediatamente por inversão, até que a mistura fique homogênea.
- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente.
- Passar o sobrenadante por uma coluna previamente equilibrada. Deixar que a solução passe pela coluna “através” da gravidade.
- Lavar a coluna com 60mL de tampão de lavagem (W8). Deixar que a solução passe pela coluna por da gravidade.
- Para eluição do DNA, adicionar 15mL do tampão de eluição na coluna. Coletar a solução contendo o DNA purificado em um tubo de 30mL.
- Adicionar 10,5mL de isopropanol ao tubo, e misturar bem.
- Centrifugar o tubo a 11000rpm por 30 minutos a 4°C. Remover e descartar o sobrenadante.
- Ressuspender o *pellet* em 5mL de etanol 70%.
- Centrifugar o tubo a 11000rpm por 5 minutos a 4°C. Remover e descartar o sobrenadante.
- Deixar o *pellet* secar a 37°C por 10 minutos.
- Ressuspender o *pellet* em 200-500 µL de tampão de eluição (TE 1X). Para pequeno número de cópias de plasmídeos, usar 50-200 µL TE 1X.
- Armazenar o DNA purificado a -20°C.

III. Preparo do fragmento gênico ARSA

-Digerir 2-30 µg do plasmídeo pBEH-HT14/CP8 com a enzima de restrição *EcoRI*, para liberação do inserto (cDNA ARSA)

-Componentes da reação de digestão:

pBEH-HT14/CP8 (3 µg/µL)	10 uL
Tampão React3 10X	5 µL
<i>EcoRI</i> (10U/uL)	1 uL

H₂O

q.s.p. 50 µL

- Incubar a 37°C por 2h.
- Checar a digestão em gel de agarose 0,8%.

IV. Purificação de DNA com o “GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit”

- Pesar um microtubo de 1,5 mL.
- Cortar a banda correspondente ao tamanho do cDNA *ARSA* (1521pb), do gel de agarose e colocar no microtubo.
- Pesar o microtubo novamente e descontar o valor inicial pesado, para saber a massa (em mg) de gel de agarose.
- Adicionar 10 µL do tampão de captura ao tubo de microcentrífuga para cada 10 mg de gel de agarose (máximo de 300 µL).
- Homogeneizar em vortex
- Incubar em banho-maria a 65°C por 10-15 minutos, até dissolver a agarose por completo.
- Transferir a solução para uma coluna contendo um tubo coletor.
- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm.
- Descartar o líquido do tubo coletor e adicionar à coluna 500 µL de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA, etanol em concentração final de 80%).
- Centrifugar nas mesmas condições anteriores e descartar o tubo coletor.
- Transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5 ml e adicionar à ela 30 µL de tampão de eluição 1X (TE).
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm para que o DNA passe da coluna para o microtubo.
- Checar em gel de agarose 0,8-1%
- Armazenar o DNA a – 20°C.

V. Preparo do vetor de expressão

-Digerir 0,1-10 µg do plasmídeo pTRACER-CMV2 (Invitrogen) com a enzima de restrição *EcoRI*, para linearização do vetor.

-Componentes da reação de digestão:

pTRACER-CMV2 (4,3 µg/µL)	2 uL
Tampão React3 10X	5 µL
<i>EcoRI</i> (10 U/uL)	1 uL
H ₂ O	q.s.p. 50 µL

-Incubar a 37°C por 2h.

-Tratar a digestão com CIAP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase- Invitrogen para evitar a recircularização do plasmídeo, acrescentando:

CIAP (1U/uL)	1 µL
Tampão de reação 10X	6 µL
H ₂ O	3 µL

-Incubar por 1 hora a 37°C em banho-maria.

-Inativar a reação acrescentando 1 µL de EDTA 0,5 M incubar a reação em banho-maria a 75°C por 10 min.

VI. Reação de ligação

-Em um microtubo de 1,5 mL acrescentar:

cDNA <i>ARSA</i>	12 µL
pTRACER-CMV2	3 µL
T4 DNA ligase (1 U/uL)	1 µL
Tampão ligase 5X	4 µL
H ₂ O	q.s.p. 20 µL

- Incubar a 16-20 °C por 4 horas, ou a 4°C *over-night*.

VII. Triagem dos clones recombinantes pelo método "microprep"

-Em microtubos de 1,5 mL transferir 15 µL de tampão de amostra 1X contendo 10 µg/mL de RNase e 15 µL de fenol:clorofórmio (1:1)

-Com ponteiros estéreis tocar as colônias formadas na placa de cultivo, transformadas com o produto de ligação, e ressuspender as bactérias na mistura contida no microtubo por pipetagem.

-Misturar em vortex e centrifugar a 14000 rpm por 5 min.

-Em seguida coletar a fase superior formada a checar em gel de agarose.

-As colônias que apresentaram inserto foram expandidas em meio LB líquido com ampicilina 100 mg/ml, mantidas sob agitação (180 rpm) por 16 horas a 36°C, para posterior extração de DNA plasmideal.

Repicar em 3-5 mL de meio LB líquido àqueles clones que obtiverem um padrão de bandas com tamanho maior (vetor+inserto) em relação ao controle (vetor).

VIII. Confirmação dos clones ARSA positivos por PCR de colônia

- Preparar a reação de PCR:

Tampão de Reação 10X	2,5 µL
MgCl ₂	1,5 µL
dNTP (2mM)	1,0 µL
Primers ARSA (20pmol/µL)	1,0 µL de cada
Taq DNA polimerase	0,2 µL
H ₂ O	q.s.p. 25 µL

-Tocar com uma ponteira estéril cada colônia de bactéria a ser testada.

-Colocar a ponteira no tubo de reação de PCR e homogeneizar umas 10 a 15 vezes.

-Realizar um controle negativo (branco), sem amostra, e um controle positivo, com 1 µL do plasmídeo pBEH-HT14/CP8.

-Levar os tubos para o termociclador para a amplificação.

-Checar em gel de agarose.

❖ Programa:

94°C	→ 5 min	}	30 ciclos
94°C	→ 30 s desnaturação		
43°C	→ 30 s anelamento		

72°C → 1 min polimerização
72°C → 7 min

Primers ARSA senso: 5' ACCCTCACAGGAATGGCCGGC 3'

Primer ARSA antisenso: 5' ACAGCCACCGTCGCAAGGA 3'

Tamanho do fragmento: ~180 pb

IX. Isolamento de clones ARSA positivos

-Inocular cada clone positivo em 3 mL de meio LB, acrescido de ampicilina.

-Incubar em *shaker* a 180 rpm, por 16 h a 37°C.

X. Extração de DNA plasmideal por lise alcalina

-Transferir 1,5 ml de um cultivo *overnight* para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.

-Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 200 µL de solução I (50 mM glicose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

-Adicionar 200 µL de solução II (1% SDS, 0,2 M NaOH), homogeneizar lentamente invertendo os tubos por 10 a 15 vezes.

-Adicionar 200 µL de solução III (3 M acetato de sódio pH 5,2), homogeneizar em vortex e centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm;

-Transferir o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga limpo e adicionar 420 µL de isopropanol.

-Homogeneizar o tubo por 10 a 15 vezes e centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm.

-Remover completamente o sobrenadante e deixar o *pellet* secar por 5 minutos a temperatura ambiente.

-Ressuspender o *pellet* em 20-50 µL de água ou tampão TE.

-Checar 3-5 µL em gel de agarose 0,8%.

OBS: A solução I é uma solução auxilia na lise celular, permitindo que o material intracelular seja liberado para o meio. A solução II por sua vez, solubiliza os lipídeos,

por conter SDS – detergente – e determina um pH alcalino, devido à presença de hidróxido de sódio, provocando a desnaturação do DNA. O acetato de sódio presente na solução III neutraliza o pH promovendo a precipitação do DNA cromossomal, das proteínas e de outras estruturas celulares, ficando o DNA plasmidial no sobrenadante. Ao adicionarmos isopropanol, ocorre a precipitação do DNA plasmidial.

XI. Verificação da orientação da inserção do cDNA ARSA

- Digerir 10 uL dos plasmídeos *ARSA* positivos com a enzimas de restrição *Clal* e posteriormente com *KpnI*.

-Componentes da reação de digestão:

pDNAs	10 µL
Tampão 10X	2,0 µL
<i>KpnI</i> (10 U/µL)	1,0 µL
H ₂ O	q.s.p. 20 µL

- Incubar a 37°C por 8 h.

- Acrescentar à reação:

Tampão 10X	2,5 µL
<i>Clal</i> (10 U/µL)	1,0 µL
H ₂ O	1,5 µL

-Incubar a 37°C por 2 h.

-Checar 5-10 µL em gel de agarose 0,8%.

-Inocular em 300-400 mL de meio LB contendo 300-400 µL de ampicilina (100mg/mL) e incubar a 37°C em *shaker*, a 180 rpm por 16h.

-Extrair plasmídeo, agora nomeado pTARSA-CMV2, com o Kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification, conforme protocolo descrito anteriormente.

* *Tamanho aproximado dos fragmentos após digestão:*

Sentido horário (inserção correta): ~ 520 pb e ~ 7.200 pb

Sentido anti-horário: ~ 1.110 pb e ~ 6.610 pb

7.1.2 Cultura Celular

I. Descongelamento e sementeira

- Retirar as células armazenadas no nitrogênio líquido e incubar a 37°C em banho-maria.
- Após o descongelamento, transferir o material imediatamente para uma placa ou garrafa de cultivo acrescido de meio DMEM, suplementado com 20% de SFB e 1% de P/S. Se necessário, dividir o conteúdo do criotubo para dois ou mais frascos de cultura.
- Homogeneizar e manter em estufa incubadora umidificada, a 37°C e 5% CO₂.
- Trocar o meio no dia seguinte, após aderência das células.
- Realizar troca de meio a cada 2 dias.

II. Divisão (Repique)

- Realizar o repique celular quando as garrafas estiverem com confluência de 80-90%.
- Descartar o meio antigo e lavar as células aderidas com PBS 1X pH 7,2
- Adicionar 800 µL de tripsina 0,25% -EDTA, homogeneizar e incubar a 37°C por 30 s a 2 min, até que se visualize ao microscópio invertido, células desprendendo-se do fundo da garrafa.
- Adicionar o dobro da quantidade de tripsina usada (1,6 mL) de meio DMEM, para inativar a ação da tripsina.
- Homogeneizar por pipetagem.
- Transferir a suspensão celular para um tubo tipo Falcon estéril e centrifugar a 800 rpm, por 7-10 minutos.
- Descartar o meio e ressuspender o *pellet* em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S.
- Homogeneizar bem e transferir a suspensão para 2-3 garrafas de cultura novas.

III. Congelamento celular

- Descartar o meio antigo e lavar as células aderidas com PBS 1X pH 7,2
- Adicionar 800 µL de tripsina 0,25% -EDTA, homogeneizar e incubar a 37°C por 30 s a 2 min, até que se visualize ao microscópio invertido, células desprendendo-se do fundo da garrafa.
- Adicionar o dobro da quantidade de tripsina usada (1,6 mL) de meio DMEM, para inativar a ação da tripsina.
- Homogeneizar por pipetagem.
- Transferir a suspensão celular para um tubo tipo Falcon estéril e centrifugar a 800 rpm, por 7-10 minutos.
- Descartar o meio e ressuspender o *pellet* em 1 mL de DMEM (suplementado com 20 % de SFB e 10% de DMSO).
- Homogeneizar e transferir a suspensão para um criotubo, previamente identificado com lápis
- Deixar as células 24 h em “*cryo-freezing*” (*container* de congelamento) contendo isopropanol.
- Transferir as amostras do *cryo-freezing* para o galão de nitrogênio líquido, identificando devidamente sua posição no *canister* e vareta.

IV. Coleta de células

- Descartar o meio antigo e lavar as células aderidas com PBS 1X pH 7,2
- Adicionar 800 µL de tripsina 0,25% -EDTA, homogeneizar e incubar a 37°C por 30 s a 2 min, até que se visualize ao microscópio invertido, células desprendendo-se do fundo da garrafa.
- Adicionar o dobro da quantidade de tripsina usada (1,6 mL) de meio DMEM, para inativar a ação da tripsina.
- Homogeneizar por pipetagem.
- Transferir a suspensão celular para um tubo tipo Falcon estéril e centrifugar a 800 rpm, por 7-10 minutos.
- Descartar o meio lavar *pellet* em 1 mL de PBS 1X pH 7,2
- Manter o material em *freezer* -20°C

IV. Contagem de células em Câmara de Neubauer

-Colocar a lamínula sobre a área de marcada na câmara de contagem. Usar lamínulas especiais que fornecem a profundidade correta da câmara de contagem. Não usar lamínulas comuns.

-Após tripsinizar as células, centrifugar e ressuspender o pellet em 1 mL de meio. Homogeneizar bem a suspensão celular e transferir 10 µL para um micro-tubo.

-Diluir a amostra nas proporções de 1:2, 1:5 ou 1:10 com corante *tripan blue* 0,2%.

-Misturar os conteúdos e retirar uma alíquota de 10 µL .

-Aplicar a amostra na câmara de contagem.

-Deixar as células sedimentarem por 2 minutos no máximo.

-Focalizar a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento (fig.1). Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a lamínula colocada corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$.

-Contar as células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem, seguindo o esquema abaixo e obter a média.

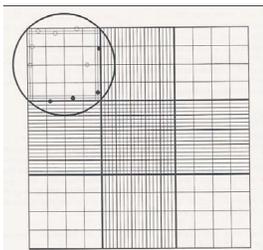
-Como a suspensão foi inicialmente diluída, o número de células contadas será igual à média multiplicada pelo fator de diluição (2, 5 ou 10)

-Para obter o número de células/mL multiplicar o valor obtido por 10.000, pois: 1 ml = 1 cc

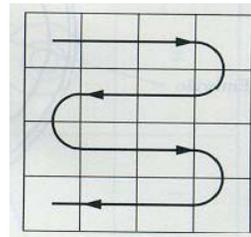
$$1 \text{ cc} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$$

Na câmara de Neubauer obtemos o número de células por $0,1 \text{ mm}^3$, então devemos multiplicar por 10, portanto $10 \times 1.000 = 10.000$

Câmara de Neubauer



Sentido da contagem

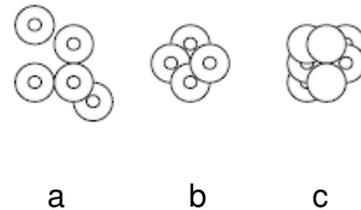


❖ Cálculo:

n° células/mL = média células viáveis x diluição x 10.000

❖ Critérios para a contagem:

- ✓ enumerar células com núcleo bem visível;
- ✓ contar células isoladas como 1 célula (a);
- ✓ contar grumos constituídos por células facilmente distinguíveis por seus núcleos e citoplasmas como grupos de células isoladas e contar cada célula (b);
- ✓ grumos, cujas células são difíceis de serem distinguidas umas das outras, devem ser contados como um único grupo (c).
- ✓ Células sobre as linhas divisórias do quadrado devem-se apenas considerar aquelas situadas no topo e no lado esquerdo.



7.1.3 Transferência Gênica

I. Transfecção das células BHK com LIPOFECTAMINE 2000

-Tripsinizar e plaquear 1×10^5 células em uma placa de cultura de 24 poços, um dia antes da transfecção.

-Para cada poço, diluir 0,8 -1,0 μ g de DNA em 50 μ L de meio DMEM (sem soro e sem antibióticos). E diluir também 1 a 3 μ L de LipofectAMINE 2000 em 50 μ L de meio DMEM (sem soro e sem antibióticos). Aguardar 5 minutos.

Nota: Seguir a proporção de 1:3 entre DNA e LipofectAMINE 2000.

-Misturar o DNA diluído com a LipofectAMINE 2000 diluída.

-Incubar à temperatura ambiente por 20 minutos.

-Remover o meio antigo dos poços e armazenar em microtubos (servirá como controle antes da transfecção) e adicionar 400 μ L de meio DMEM (sem antibióticos)

-Adicionar o complexo diretamente a cada poço da placa contendo e misturar delicadamente.

-Incubar a 37°C com 5% de CO₂ por 24h, não sendo necessário remover o complexo antes desse período. Alternativamente, o meio poderá ser trocado após 5 h da transfecção sem diminuir a eficiência desta. A primeira troca de meio deve ser feita em DMEM suplementado com 10 %SFB e 1% de P/S.

-Ensaio enzimático de extrato celular e/ou meio de cultivo, para medir a atividade do gene pode ser realizado 24 a 72 h após a adição do complexo, dependendo do tipo celular e da atividade do promotor.

Para expressão estável, 24-48h após a transfecção, deve-se passar as células para uma placa de 6 poços, realizando diferentes diluições e adicionar ao meio o antibiótico de seleção.

-Alguns dias ou semanas serão requeridos para a expressão estável.

II. Transfecção das células BHK com JetPEI

-Tripsinizar e plaquear 1×10^5 células em uma placa de cultura de 24 poços, um dia antes da transfecção.

-Para cada poço, diluir 1,0 µg de DNA em 50 µL de solução de NaCl 150 mM. Diluir também 3 µL de Jet PEI em 50 µL solução de NaCl 150 mM.

-Misturar a solução de JetPEI ao DNA (Não fazer em ordem inversa)

-Incubar à temperatura ambiente por 20 minutos.

-Remover o meio antigo dos poços e armazenar em microtubos (servirá como controle antes da transfecção) e adicionar 400 µL de meio DMEM (sem antibióticos)

-Adicionar o complexo diretamente a cada poço da placa contendo e misturar delicadamente.

-Incubar a 37°C com 5% de CO₂ por 24h, não sendo necessário remover o complexo antes desse período. A primeira troca de meio deve ser feita em DMEM suplementado com 10 %SFB e 1% de P/S.

-Ensaio enzimático de extrato celular e/ou meio de cultivo, para medir a atividade do gene pode ser realizado 24 a 72 h após a adição do complexo, dependendo do tipo celular e da atividade do promotor.

Para expressão estável, 24-48h após a transfecção, deve-se passar as células para uma placa de 6 poços, realizando diferentes diluições e adicionar ao meio o antibiótico de seleção.

-Alguns dias ou semanas serão requeridos para a expressão estável.

III. Seleção com Zeocina

-Concentrações de 50 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zeocina são usadas para a seleção dos transfectantes estáveis e a metade da dose de seleção é usada para manutenção da cultura.

-As células transfectadas com o plasmídeos contendo o cassete de expressão codificarão o gene de resistência ao antibiótico.

-Para expressão estável, 24-48h após a transfecção, deve-se passar as células para uma placa de 6 poços, semeando-as em diferentes diluições e adicionando ao meio o antibiótico de seleção (zeocina).

-Um poço deverá ser usado como controle. Assim que todas as células deste tiverem morrido, a seleção estará completa. Nesse momento diminuir a quantidade de antibiótico para a dose de manutenção.

-A concentração do antibiótico é determinada no ensaio dose - resposta e varia de acordo com cada tipo celular.

-Após 10 a 20 dias as colônias resistentes estarão visíveis. Neste momento, isolar cada uma delas em um poço de uma placa de 24.

-Quando cada clone isolado atingir 90% de confluência, realizar ensaio enzimático do sorenadante. Para isso, realizar a troca de meio 24h antes do ensaio.

-Escolher os clones que tenham maior valor de expressão da enzima de interesse (ARSA).

IV. Ensaio Dose – Resposta

-Adicionar $x \mu\text{L}$ de 100 mg/mL da solução de antibiótico Zeocina (para concentrações finais de 0 a 1.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em incrementos de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

- Tripsinizar as células e plaqueá-las a uma concentração de aproximadamente 4.000 céls/mL (25% de confluência) em placas de 12 poços. Adicionar 1 mL de meio DMEM contendo Zeocina.
- Incubar as placas em estufa de CO₂ a 37°C.
- Entre o 7º e 15º dia cerca de 80% das células deverão ter morrido.
- Para linhagens com alta taxa replicativa pode ser necessário incubar as placas a 4°C por 2-4h. Neste caso, não esquecer de tamponar o meio com HEPES.
- Determinar a concentração mínima de antibiótico que matará todas as células.
- Usar a próxima concentração para a seleção.

7.1.4 Ensaios Enzimáticos

I. Ensaio da β -Galactosidase (β -Gal)

- Ressuspender o *pellet* celular em aproximadamente 600 μ L de água de injeção.
- Sonicar a amostra por 20s, descansar 30s e sonicar mais uma vez por mais 20s em gelo.
- Centrifugar a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada.
- Preparar amostras para o ensaio, colocando em cada tubo de ensaio os seguintes reagentes:

	Teste	Branco
Amostra	50 μ L	-
PBS 10 mM pH 7,2	-	50 μ L
NaCl 0,2 M	50 μ L	50 μ L
Substrato 4-MU	100 μ L	100 μ L

- Incubar a 1 hora por 37°C.
- Inativar a reação acrescentando 1,5 mL de tampão glicina
- Ler a fluorescência no espectrofluorímetro (Excitação 365 nm e emissão 450 nm).
- Usar a curva de 4-metilumbeliferil (4- MU) para determinar o QM.

❖ **Cálculos:**

$$\text{nmol/h/mg prot} = \text{delta fluorescência} \times \text{QM} \times 2000 / \text{conc prot } \mu\text{g em } 100 \mu\text{L}$$

$$\text{QM} = [] \text{ MU} / \text{Fluorescência}$$

* Valores de Referência (para fibroblastos): 395- 1440 nmol/h/mg proteína

❖ **Reagentes:**

✓ *4-Metilumbiliferil – β – D- Galactosideo 1,33 mM (substrato)*

Pesar 1 mg do substrato e dissolver em 1,5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 4,0.

✓ *Tampão Citrato-Fosfato 0,1 M pH 4,0*

Pesar 3,58 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 1,93 g de ácido cítrico monohidratado. Transferir os reagentes para um bequer e dissolver em 50 mL de água destilada.

Ajustar o pH e completar o volume para 100 mL. Armazenar a -20°C .

✓ *Cloreto de Sódio 0,2 M*

Pesar 1,17 g de NaCl e dissolver em 50 mL de água destilada. Após dissolução completar o volume para 100 mL. Armazenar a 4°C .

✓ *Tampão Glicina-NaOH 0,5 M pH 10,3*

Pesar 37,53 g de glicina e 12 g de NaOH, transferir para um béquer e dissolver em 800 mL de água destilada. Ajustar pH 10,3. Completar o volume para 100 mL. Conservar a 4°C .

❖ **Curva Padrão de 4-MU:**

- 2,5 μM = 100 μL de 4-UM 250 μM em um volume total de 10 mL de água destilada (alíquotas de 200 μL – 0,5 nmol)
- 5 μM = 200 μL de 4-UM 250 μM em um volume total de 10 mL de água destilada (alíquotas de 200 μL – 1 nmol)

- 10 μM = 400 μL de 4-UM 250 μM em um volume total de 10 mL de água destilada (alíquotas de 200 μL – 2 nmol)
- 15 μM = 600 μL de 4-UM 250 μM em um volume total de 10 mL de água destilada (alíquotas de 200 μL – 3 nmol)

II. Ensaio da Arilsulfatase A (ARSA)

- Ressuspender o *pellet* celular em aproximadamente 600 μL de água de injeção.
- Sonicar a amostra por 20s, descansar 30s e sonicar mais uma vez por mais 20s em gelo.
- Centrifugar a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada.
- Preparar amostras para o ensaio, colocando em cada tubo de ensaio os seguintes reagentes:

	Teste	Branco
Amostra	80 μL	80 μL
Substrato	400 μL	-

- Para cada amostra há o seu branco correspondente.
- Incubar os testes a 0°C por 5 horas, juntamente com o frasco do substrato que sobrou. Deixar os brancos no *freezer* -20°C.
- Após 5 h, acrescentar 400 μL do substrato nos tubos contendo os brancos.
- Inativar as reações acrescentando 400 μL de NaOH 1N em todos os tubos.
- Ler a absorvância a 515 nm.
- Fazer os pontos da curva do 4-nitrocatecol e ler como padrão.

❖ Cálculos:

QM = [] de cada ponto / Absorbância

QM média = Somas dos QMs/ números pontos da curva usados

$$\text{nmol/h/mg prot} = \text{delta abs.} \times \text{QM média} \times 250 / \text{conc prot } \mu\text{g em } 100 \mu\text{L}$$

$$\text{nmol/h/mL} = \text{delta Abs.} \times \text{QM média} \times 2,5$$

* Valores de referência (para fibroblastos): 20-50 nmol/h/mg proteína.

❖ Reagentes:

✓ *4-Nitrocatecol Sulfato, potassium salt 10 mM (substrato)*

Manter a proporção de 3,1 mg do substrato para 1 mL do tampão acetato de sódio 0,5M, pirofosfato de sódio, NaCl 10% pH5,0. O volume de substrato a ser preparado é diretamente proporcional ao número de amostras a serem analisadas. Cada amostra consome 800 µL de substrato (branco + teste).

✓ *Tampão Acetato de Sódio 0,5 M, Pirofosfato de Sódio, NaCl 10% pH 5,0*

Pesar 6,8 g de acetato de sódio 3H₂O (se for acetato de sódio anidro 4,1 g), 22,3 mg de pirofosfato de sódio e 10 g de NaCl. Diluir em aproximadamente 50 mL de água destilada. Acertar o pH com ácido acético 1 M (aproximadamente 7 mL), e completar o volume com água destilada até 100 mL.

✓ *Hidróxido de Sódio 1N*

Pesar 4g de NaOH e diluir em 100mL de água destilada.

✓ *4-Nitrocatecol 60 mM (solução estoque - curva padrão)*

Pesar 4,65 mg de 4-nitrocatecol, transferir o reagente para um béquer pequeno e dissolver em 500 µL de água destilada, homogeneizando bem.

✓ *4-Nitrocatecol 60 mM (solução de uso - curva padrão)*

Medir 125 µL da solução estoque e colocar em um béquer. Diluir em 25 mL de água destilada. Transferir para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada, homogeneizando com movimentos de inversão.

❖ Curva Padrão de 4- Nitrocatecol

-Retirar 480 µL de cada ponto da curva e colocar em tubos de ensaio.

Tubos	1	2	3	4	5
	[7]	[12]	[22]	[30]	[36]
Sol. Uso (mL)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Àgua destilada (mL)	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5

-Em um tubo, que será o branco, colocar 480 µL de água destilada.

-Adicionar 400 µL de NaOH 1N em cada tubo.

-Ler a absorbância em espectrofotômetro a 515 nm.

III. Dosagem de proteínas em Microplacas (Método de Lowry-1961)

-Preparar uma placa de 96 poços e pipetar, em duplicata, os pontos da curva padrão, conforme tabela:

	H₂O	ALBUMINA
Branco	50 µL	---
A1	48,7 µL	1,25
A2	47,5 µL	2,5
A3	45 µL	5
A4	40 µL	10
A5	30 µL	20
A6	20 µL	30
A7	10v	40

-Pipetar as amostras conforme tabela:

	H₂O	AMOSTRA
Amostra	40 uL	10 µL

-Acrescentar 150 µL do reativo C em cada poço (da curva padrão e amostras).

-Dar um pulso (agitar).

-Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos.

-Adicionar 15 µL de Folin

-Incubar na ausência de luz por 30 minutos

-Ler a absorbância 650nm.

❖ **Cálculos:**

Usar o valor da média das absorbâncias entre as duplicatas.

FCP (Fator de Calibração Parcial)= [] de cada ponto/absorbância

FCM (FCP média)= Fazer a média dos 7 pontos da curva

Cálculo=

$$\mu\text{g prot. em } 100 \mu\text{L} = \text{delta Abs.} \times \text{FCM} \times 10$$

❖ **Reagentes:**

✓ *Reativo A*

- Na₂CO₃ 2% (2g)

- NaOH 0,4% (0,4g)

- Tartarato sódico-potássico 16% (0,16g)

- SDS 1% (1g)

- Dissolver em 90mL de H₂O destilada em ultra-som e completar até 100mL.

✓ *Reativo B*

- CuSO₄ + 5H₂O 4% (2g em 50mL)

✓ *Reativo C*

- Preparar uma mistura dos reativos A e B, nas proporções proporções 100:1 (em volume).

✓ *Reativo de Folin-Ciocalteu*

- Reativo comercial diluído a 1:1 em água

✓ *Solução padrão*

- Albumina 0,25% (25mg em 100mL)

❖ Curva Padrão de Albumina

- A1 ---- 0,03125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A2 ---- 0,06250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A3 ---- 0,12500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A4 ---- 0,25000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A5 ---- 0,50000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A6 ---- 0,75000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- A7 ---- 1,00000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

7.1.5 Produção de Células Encapsuladas

I. Preparo dos reagentes e equipamentos

- Um dia antes de encapsular as células, esterilize em autoclave um béquer de 80-100 mL e a agulha da Unidade de Encapsulação.
- Pesar o alginato e espalhá-lo em uma fina camada sobre um papel alumínio. Esterilizar em ultra-violeta (UV) por no mínimo 30 minutos. O alginato não pode ser autoclavado.
- Após pesar o alginato, coloque-o no fluxo laminar, junto com um agitador magnético, bomba de infusão e suporte para fazer cápsulas. Ligue a luz UV por 30 a 40 minutos.
- Dentro do fluxo, colocar meio DMEM no béquer estéril, o alginato e o agitador magnético. Tampar com algumas gazes estéreis e por último papel alumínio. Levar para o agitador.
- Enquanto o alginato dissolve, colocar o restante da unidade de encapsulação no UV.

II. Encapsulação de clone superexpressando ARSA

- Tripsinizar as células que serão encapsuladas. Para cada poço de uma placa de 6 wells é encapsulado um volume de 400 μL contendo 2×10^5 células. Ressuspendê-las em DMEM-Alginato 1,5%.
- Transferir a suspensão celular para uma seringa de 10 mL.
- Acoplar a seringa na Bomba de Infusão JMS (modelo SP-500).

- Na extremidade da seringa adaptar um extensor de 60 cm.
- Na outra extremidade do extensor acoplar a unidade de encapsulação (Nisco).
- Adaptar a unidade de encapsulação no seu suporte à uma altura de aproximadamente 6 cm.
- A suspensão celular deverá ser infundida a uma velocidade constante de 40 mL/h.
- As gotas geradas deverão cair numa placa contendo uma solução de CaCl_2 125 mM estéril por filtração, empurradas por um fluxo de ar (3,5 a 4,0 L/min).
- Remover o CaCl_2 da placa.
- Lavar as cápsulas com PBS 1X.
- Acrescentar 2 mL de meio DMEM e incubar as cápsulas em estufa de CO_2 a 37°C.
- Manter as cápsulas sob condições normais de cultivo celular.
- Trocar o meio duas vezes por semana.

III. Co-cultivo de células encapsuladas e fibroblastos

- Plaquear, em cada poço de placa de 6 *wells*, 1×10^4 fibroblastos derivados pacientes com LDM.
- Encapsular os clones e mantê-los em estufa de CO_2 a 37°C, por 24 horas.
- Após 24 horas transferir as cápsulas estáveis e colocá-las sobre os fibroblastos.
- Trocar o meio a cada 2 dias.

7.2 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AOS RESULTADOS

Nesta secção serão apresentadas informações adicionais, referentes aos resultados obtidos com a construção do vetor, seleção de clones estáveis, padronização da técnica de encapsulação e tratamentos dos fibroblastos com as células encapsuladas. Essas informações contribuirão para a discussão do trabalho.

7.2.1 Clonagem Molecular

I. Preparo do fragmento gênico *ARSA*

O plasmídeo pBEH HT14/CP8 (figura 5), foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação do cDNA do gene *ARSA* conforme mostra figura 6.

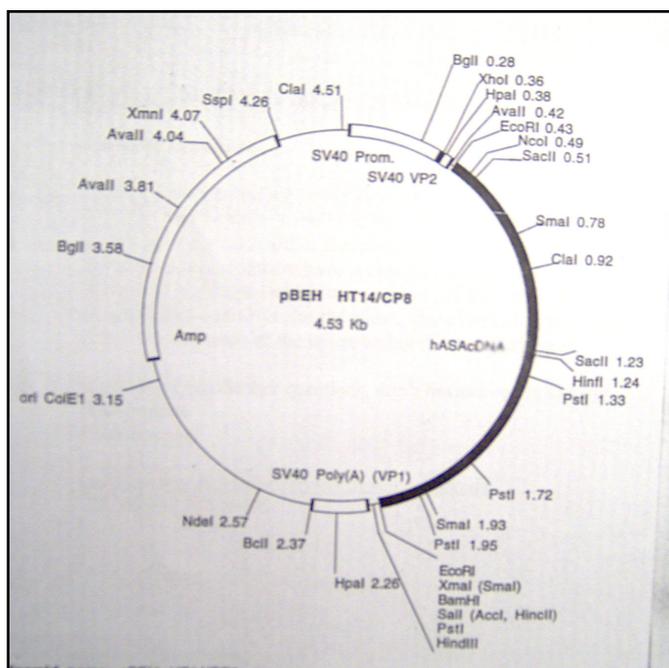


Figura 5. Mapa do plasmídeo pBEH HT14/CP8 gentilmente cedido pelo Dr. Volkmar Gieselmann, Universidade de Bonn, Alemanha)

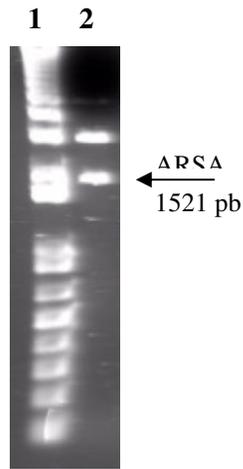


Figura 6. Digestão do plasmídeo pBEH HT14/CP8 com a enzima *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 1%. 1. Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); 2. Liberação do cDNA de ARSA após digestão do plasmídeo.

II. Preparo do vetor de expressão

O vetor (pTRACER-CMV2), foi igualmente digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para sua linearização e para deixar as extremidades compatíveis à do inserto.

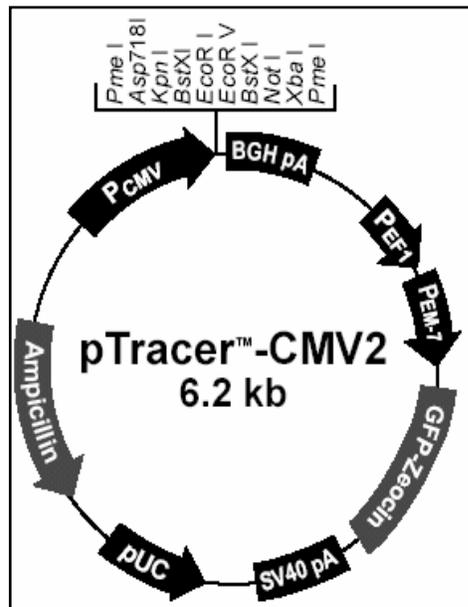


Figura 7. Mapa do vetor de expressão pTRACER-CMV2 (Invitrogen).

III. Triagem dos clones recombinantes pelo método “microprep”

O produto da ligação descrito 7.1.1 foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α . Para selecionar os clones recombinantes, foi realizada uma triagem rápida com fenol-clorofórmio (1:1) e selecionadas algumas colônias, cujo tamanho demonstrou ser maior que o controle sozinho (pTRACER-CMV2), conforme figura abaixo:

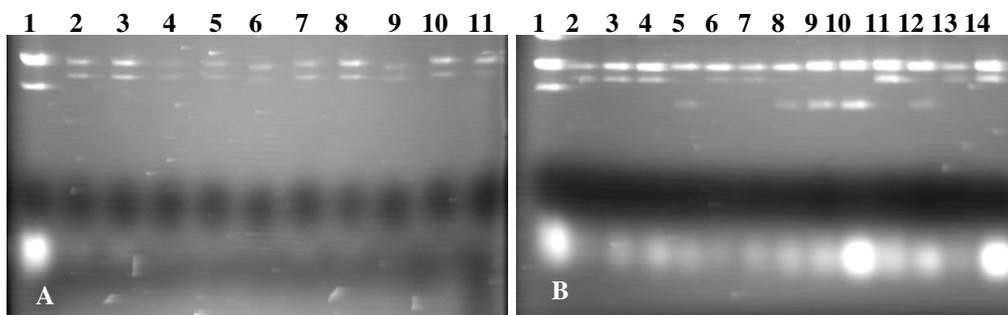


Figura 8. Extração de DNA com fenol-clorofórmio para triagem de clones recombinantes. Gel de agarose 0,8%. A1. pTRACER-CMV2; A2 a A11. Clones recombinantes (pTARSA-CMV2); B1. pTRACER-CMV2; B2 a B4, B6, B7, B11, B13 e B14. Clones recombinantes (pTARSA-CMV2); B5, B8, B9, B10 e B12. Clones não recombinantes.

Os clones A2, A3, A11 e B2, B3, B4, B6, B11 e B14 tiveram seu DNA amplificado por PCR com os *primers* específicos para ARSA, para confirmação dos recombinantes (figura 9).

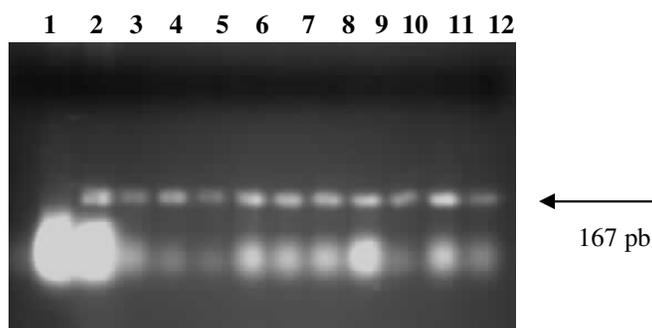


Figura 9. Amplificação do gene *ARSA* nos clones transformados. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 1. Controle negativo/Branco; 2. pTRACER-CMV2; 3. pBEH HT14/CP8; 4 a 13. Clones A1, A2, A3, A11, B2, B3, B4, B6, B11 e B14 respectivamente.

IV. Verificação da orientação da inserção do cDNA ARSA

Para verificar se a inserção do gene foi no sentido correto (horário), o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *ClaI*. Sendo que os tamanhos esperados após a digestão foram de ~ 520 pb e ~ 7.200 pb para a orientação correta (sentido horário) e ~ 1.110 pb e ~ 6.610 pb para orientação invertida (sentido anti-horário). Todos os clones analisados estavam com a inserção na orientação correta, conforme figura 10.

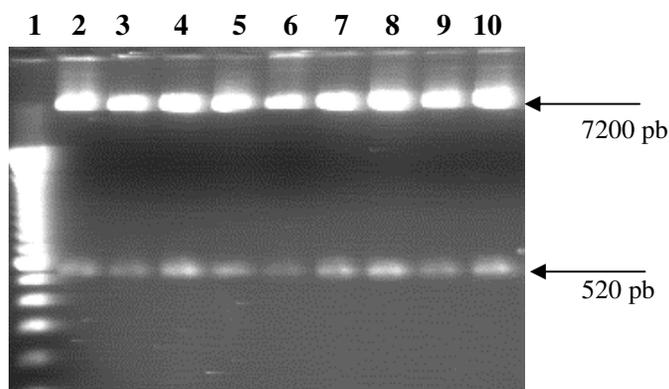


Figura 10. Digestão do plasmídeo pTARSA-CMV2 com as enzimas de restrição *ClaI* e *KpnI*, Eletroforese em gel de agarose 0,8%. 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 2 ao 10. pTARSA-CMV2 com inserção na orientação correta.

O mapa do plasmídeo construído, nomeado de pTARSA-CMV2, está representado na figura a seguir:

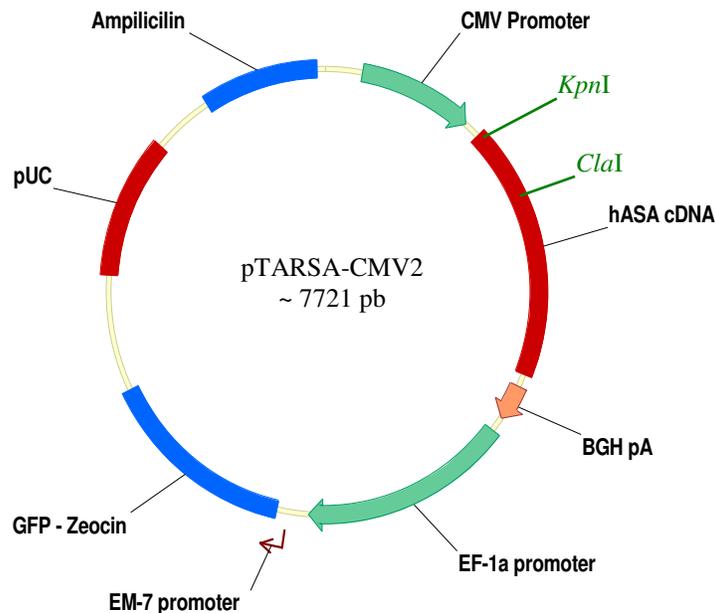


Figura 11. Desenho esquemático do vetor pTARSA-CMV2, gerado pelo software Vector NTI 8.0

7.2.2. Encapsulação Celular

I. Padronização da técnica de encapsulação celular

As células BHK foram mantidas em condições padrões de cultivo celular até atingirem 90 a 95% de confluência. Nesse momento foram coletadas com tripsina 0,25% EDTA e utilizadas para padronizar a técnica de encapsulação.

Uma média de $2,5 \times 10^6$ cels/mL foram misturadas a uma solução de alginato de sódio 1,5%. A suspensão foi submetida a três diferentes de fluxo de infusão (30 mL/h, 40 mL/h e 60 mL/h) numa bomba de infusão com seringa (JMS modelo SP-500), Dentre as velocidades de infusão testadas. Destas àquela que demonstrou melhor padrão no tamanho e formato das cápsulas foi de 40 mL/h.

Três velocidades de fluxo de ar também foram analisados: 3 L/min, 4 L/min e 6 L/min. Além disso também variou a altura entre a agulha e a solução de CaCl_2 entre 6 cm, 10 cm e 15 cm. A seringa foi acoplada à Unidade de Encapsulação (Nisco) e a

altura que demonstrou não causar deformações foi de 6 cm, enquanto o fluxo de ar que demonstrou formação de cápsulas de menor tamanho foi com velocidade de 4 L/min. A figura 12 mostra o aparato usado na encapsulação celular.

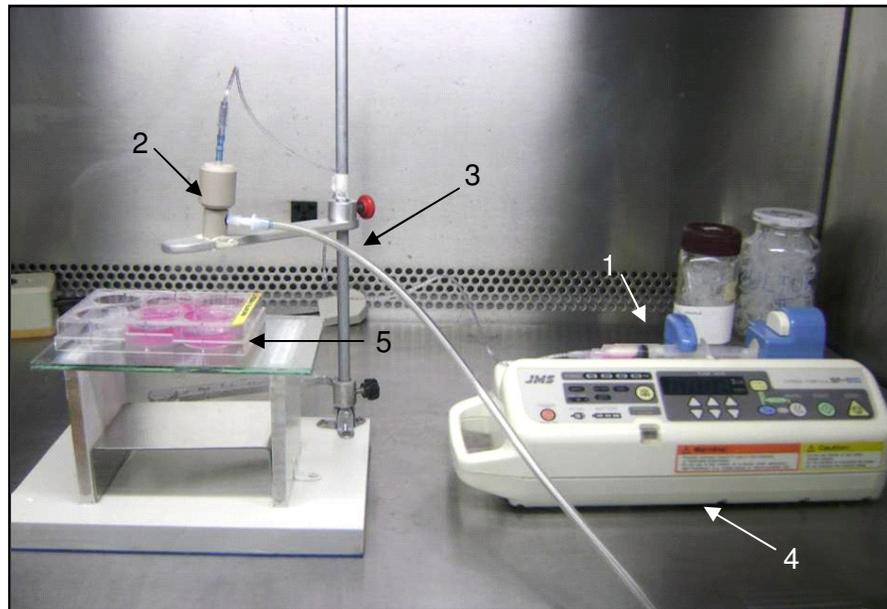


Figura 12. Metodologia da Encapsulação – 1) suspensão celular com alginato, 2) unidade de encapsulação, 3) fluxo de ar, 4) bomba de infusão e 5) Placa contendo CaCl_2 .

O tamanho das cápsulas foi medido com o Software Image Pró-Plus[®] (figura 13) e variaram de 300 a 800 μm , sendo a maioria de de 400 μm .

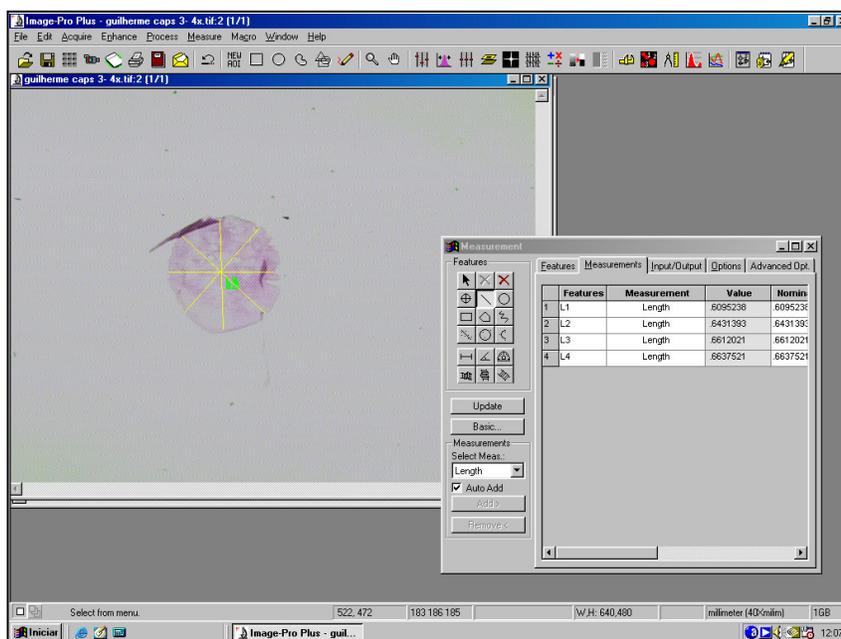


Figura 13. Software ImagePró-Plus usado para medir o tamanho das cápsulas.

Visando verificar se havia diferença na cinética de crescimento das células encapsuladas, nós encapsulamos também células de hepatocarcinoma humano (HepG2).

As BHKs foram mantidas viáveis em cultura por cerca de 40 dias sem ser notada a presença de super-crescimento com extravasamento celular. O mesmo não aconteceu para as células HepG2, cujo super-crescimento foi detectado após 28 dias de cultivo e nas quais houve ainda o crescimento de células sob a porção pericapsular. Este super-crescimento foi responsável por algumas deformações nas cápsulas. (figura 14)

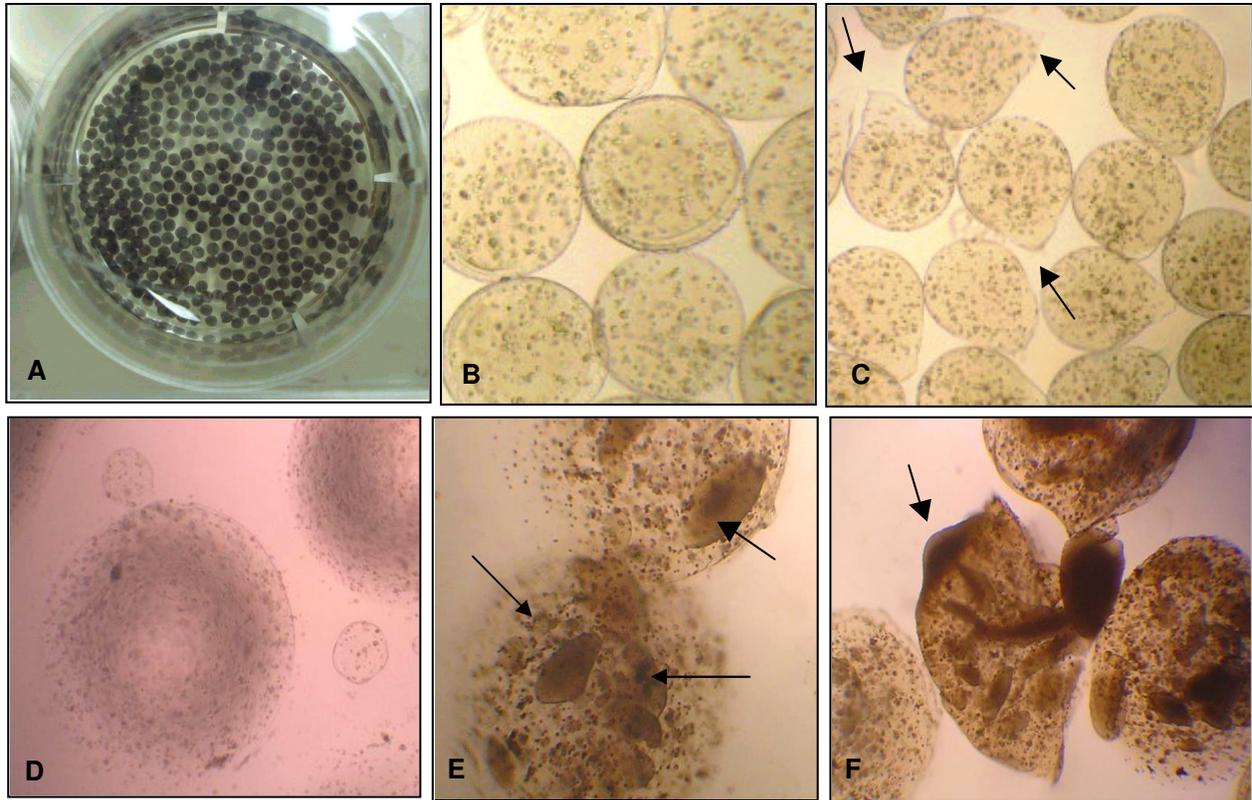


Figura 14. Células encapsuladas. *A.* Visão macroscópica das cápsulas coradas com Nankin; *B.* Células BHK encapsuladas (40x); *C.* Células BHK após um dia de encapsulação -as setas indicam irregularidades físicas formadas devido ao fluxo de ar (40x); *D.* Células BHK após 21 da encapsulação (40x); *E.* Células HepG2 após 28 da encapsulação -as setas indicam áreas de super-crescimento celular(40x) e *F.* Deformação nas cápsulas devido a super-crescimento das células HepG2 após 28 da encapsulação – as setas indicam áreas de crescimento extracapsular (40x).

7.2.3 Reversão da deficiência de ARSA nos fibroblastos tratados

Atividade da enzima referência (β -gal) nos fibroblastos tratados com a células rBHK encapsuladas encontra-se no gráfico a seguir

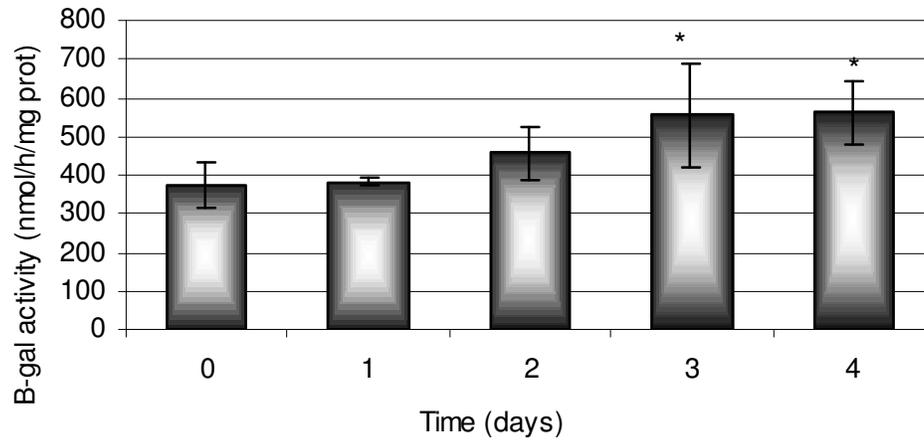


Gráfico 1. Atividade da enzima referência (β -gal) nos fibroblastos tratados com a células rBHK. (* $p < 0,05$ One-way ANOVA)