

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular da UFRGS



**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PRÉ-CLÍNICO DE TERAPIA GÊNICA,  
BASEADA EM VETORES ADENO-ASSOCIADOS, DIRECIONADO PARA O  
TRATAMENTO DAS MANIFESTAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM UM  
MODELO MURINO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

**RENATA COURA**

**ORIENTAÇÃO: DRA. NANCE BEYER NARDI**

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

**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PRÉ-CLÍNICO DE TERAPIA GÊNICA,  
BASEADA EM VETORES ADENO-ASSOCIADOS, DIRECIONADO PARA O  
TRATAMENTO DAS MANIFESTAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM UM  
MODELO MURINO DE MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

**Renata dos Santos Coura**

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

**Orientadora:  
Nance Beyer Nardi**

**Porto Alegre  
Abril de 2009**

**À minha família,**  
Por vocês cheguei até aqui;  
Por vocês chegarei onde for preciso.

**Em especial, à minha mãe e à minha irmã,**  
Minhas melhores amigas, meu porto seguro.  
Um amor maior que eu.

**À minha avó querida,**  
Com todo meu amor.

**Ao meu avô, Odimar Pinto de Oliveira,**  
Meu companheiro de todas as horas,  
meu maior icentivador, meu melhor amigo.  
Sem você o caminho seria muito mais difícil.  
A ti dedico esta tese e todo o meu amor!

## **Gratidão**

*Sentimento sublime*

*Dos mais profundos recantos do coração.*

*Gratidão é satisfação,*

*Satisfação é plenitude,*

*Plenitude é felicidade*

*E a felicidade atrai tudo que há de bom e bem.*

*Gratidão pela vida;*

*Gratidão pelo céu azul e pelo sol,*

*Ou pela chuva e o vento;*

*Gratidão pelo que se é e pelo que se tem;*

*Gratidão pelo que já teve e pelo que terá;*

*Pelo que foi e pelo que será;*

*Gratidão pelas pessoas que cruzam nossos caminhos,*

*E pelas que caminham sempre conosco;*

*Gratidão pelos que nos deram vida,*

*No momento do nascimento ou depois dele;*

*Gratidão pelas pessoas que nos ensinaram e pelas que nos ensinam algo de valioso, iluminando nosso caminho;*

*Gratidão pelos ensinamentos;*

*Gratidão até por aquelas pessoas que nos criam obstáculos;*

*Gratidão pelos obstáculos;*

*Gratidão é mais que um sentimento,*

*É um estado da nossa essência.*

*Quem é essencialmente grato,*

*Vê em tudo contentamento e motivo de agradecer.*

*Renata Coura*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora, Profa. Nance Beyer Nardi, graças a quem cheguei até aqui. Obrigada pela sua confiança e pelo exemplo de pessoa e profissional que sempre foi pra mim.

A toda a equipe do Laboratório de Imunogenética pela parceria nestes quatro anos de doutorado, em especial ao chefe do Laboratório, Prof. José Artur Bogo Chies. Faço um agradecimento também especial ao Tiago Dalberto, pela colaboração.

À equipe do Laboratório de Patologia da FFCMPA: Dra Marilda Fernandes, Rosalva, Suelen, e especialmente, à Francele e ao Guilherme. Parceiros de perfusões e lâminas de histologia!

À equipe do Laboratório de Neurobiologia da UFRJ, em especial ao Dr. Rafael Linden e à Dra. Hilda Petrs, pelo gratificante intercâmbio científico e pela forma como me acolheram.

Ao Dr. André Schmidt, do departamento de Bioquímica da UFRGS, pelos testes de dor.

A toda a equipe da *Unité de Rétrovirus et Transfert Genetique*, do Instituto Pasteur, em especial ao Dr. Jean Michel Heard, que me acolheu sem reservas e me fez parte integrante de sua equipe. Com eles vivi e aprendi 9 anos em 9 meses.

À minha amiga Silvia Terra, primeiramente pela sua valiosa amizade e depois pela parceria de trabalho.

À minha amiga Priscila Vianna, colega de laboratório na UFRGS que se tornou uma grande e verdadeira amiga no decorrer de nossas aventuras parisienses.

Ao Elmo e à Ellen, amigos e profissionais sem igual. Obrigada por todos estes anos juntos!

Agradeço à minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente em todos os meus desafios e decisões. A ela peço desculpa pela ausência em todos estes anos e agradeço o profundo amor e confiança que me servem de alicerce para buscar e realizar meus sonhos e ser quem hoje sou. Obrigada mãe, vô, vó, irmãos, meu sobrinho Tarik, Cami e Caio... e a todos que cuidam de vocês por mim! Esta tese, assim como tudo em minha vida, é dedicada a cada um de vocês!

Ao Fabiano, pelo companheirismo e amizade incondicionais. Meu amor por ti é eterno e incondicional!

Agradeço aos meus amigos nesta jornada acadêmica: Louise, Ana Paula, Maríndia, Rodrigo, Tati, Carla, Gabi, Binha, Milton, Elise, Pedro, prof. Thales Freitas... Minha vida simplesmente não seria a mesma sem a amizade e o companheirismo de vocês. Obrigada por cada momento que passamos juntos!

Ao Maicon, por existir em minha vida e participar dela.

Por fim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Ao suporte e apoio financeiros do CNPq, que tornarão possível a realização deste trabalho.



**É pela ação efetiva que alcançaremos o que tantos sonharam e não conseguiram – porque apenas sonharam, mas não agiram.**  
(DeRose)

**Problema é o preâmbulo da solução.**  
(DeRose)

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO</b>	16
<b>PARTE I- BASES BIOQUÍMICAS</b>	18
<b>1. O LISOSSOMA</b>	18
1.1 PROTEÍNAS LISOSSOMAS DE MEMBRANA	21
1.2 AS ENZIMAS LISOSSOMAS	22
1.2.1 BIOGÊNESE DAS ENZIMAS LISOSSOMAS	23
1.2.2 OS RECEPTORES MANOSE-6-FOSFATO	28
1.2.3 VIAS INDEPENDENTES DE MANOSE-6-FOSFATO	30
<b>2. OS GLICOSAMINOGLICANOS</b>	33
2.1 HEPARAN SULFATOS	37
2.1.1 <i>ESTRUTURA DOS HEPARAN SULFATOS</i>	37
2.1.2 <i>CATABOLISMO DOS HEPARAN SULFATOS</i>	37
2.1.3 <i>O PAPEL DOS HEPARAN SULFATOS</i>	38
2.2 DERMATAN SULFATOS	43
2.2.1 <i>ESTRUTURA DOS DERMATAN SULFATOS</i>	43
2.2.2 <i>CATABOLISMO DOS DERMATAN SULFATOS</i>	43
2.2.3 <i>O PAPEL DOS DERMATAN SULFATOS</i>	44
<b>PARTE II – DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS</b>	46
<b>1. DOENÇAS LISOSSOMAS DE DEPÓSITO</b>	47
1.1 <i>GÊNÉTICA, SINAIS CLÍNICOS E VARIABILIDADE FENOTÍPICA</i>	49
1.2 <i>DIAGNÓSTICO PRÉNATAL</i>	51
1.3 <i>PREVALÊNCIA</i>	52
<b>2. DOENÇAS LISOSSOMAS DE DEPÓSITO E NEURODEGENERAÇÃO</b>	53
<b>3. AS MUCOPOLISACARIDOSES</b>	55
3.1 <i>HISTÓRICO</i>	56
3.2 <i>SINAIS CLÍNICOS</i>	57
3.3 <i>DIAGNÓSTICO</i>	58
3.4 <i>GENÉTICA E PREVALÊNCIA</i>	58
3.5 <i>DISFUNÇÕES SECUNDÁRIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL</i>	59
3.6 <i>AUMENTO SECUNDÁRIO DE OUTRAS ENZIMAS LISOSSOMAS</i>	59
3.7 <i>AUMENTO SECUNDÁRIO DE PROTEÍNAS LISOSSOMAS</i>	60
3.8 <i>CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS</i>	61
<b>4. MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I</b>	63
<b>PARTE III - ABORDAGENS TERAPÊUTICAS</b>	65
<b>1. TERAPIA SISTÊMICA</b>	65
1.1 <i>TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA</i>	65
1.2 <i>TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA</i>	69
1.3 <i>TRANSPLANTE DE SANGUE DE CORDÃO</i>	71
<b>2. TERAPIA GÊNICA</b>	72
2.1 <i>TERAPIA GÊNICA PARA O TRATAMENTO DA MPSI</i>	82
<b>3. TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS</b>	84
<b>I – The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy</b>	90
<b>II – A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy</b>	98
<b>OBJETIVO</b>	109
<b>OBJETIVO GERAL</b>	110
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	110
<b>CAPÍTULO II – TERAPIA GÊNICA</b>	111
<b>III- AAV2.5 brain-directed gene therapy in MPSI mice</b>	112
<b>CAPÍTULO III - TERAPIA CELULAR</b>	133
<b>IV– Effect of administration route on the biodistribution of eGFP+ murine mesenchymal stem cells in C57Bl/6 normal mice – a qualitative analysis</b>	134
<b>CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO</b>	152
<b>TERAPIA CELULAR</b>	153
<b>TERAPIA GÊNICA</b>	154
<b>ANEXO – OUTRAS PUBLICAÇÕES</b>	158
<b>Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB</b>	159
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	199



## ABREVIÇÕES

<b>μPAR</b>	Plasminogênio tipo uroquinase
<b>AAV</b>	Vírus adeno-associado
<b>Ad</b>	Adenovírus
<b>ATP</b>	Adenosina tri-fosfato
<b>CD</b>	Cátion-dependente
<b>CD-MPR</b>	Receptor de manose-6-fosfato cátion-dependente
<b>CI</b>	Cátion-independente
<b>CIMPR</b>	Receptor de manose-6-fosfato cátion-independente
<b>CS</b>	Condroitin sulfato
<b>DLD</b>	Doença Lisossomal de Depósito
<b>DMH</b>	Doença metabólica hereditária
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DS</b>	Dermatan sulfato
<b>DSPG</b>	Dermatan sulfato proteoglicano
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EIM</b>	Erro inato do metabolismo
<b>FGE</b>	Formyl glycine forming enzyme
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FGFR</b>	Receptor de FGF
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GlcNac</b>	N-acetilglicosamina
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>H+</b>	Ion de hidrogênio
<b>HS</b>	Heparan sulfato
<b>HSC</b>	Célula-tronco hematopeiética
<b>HSPG</b>	Heparan sulfato proteoglicano
<b>HSV</b>	Herpes vírus
<b>IC</b>	Intracarotídea
<b>IDUA</b>	α-L-iduronidase
<b>IGF-II</b>	Insulin-like growth factor II
<b>IN</b>	Intranasal
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>ITR</b>	Inverted Terminal Repeat
<b>IVC</b>	Intraventricular cerebral
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>KO</b>	Knock-out
<b>KS</b>	Keratan sulfato
<b>LAMP</b>	Lysosome-Associated Membrane Protein
<b>LCR</b>	Líquido céfalo-raquidiano
<b>LIF</b>	Leukemia inhibitory factor
<b>LIMP</b>	Lysosome integral membran proteins
<b>MPR</b>	Receptor de manose-6-fosfato
<b>MPS</b>	Mucopolissacaridose
<b>MSC</b>	Célula-tronco mesenquimal
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction

<b>RER</b>	Retículo endoplasmático rugoso
<b>RhIDUA</b>	Idua recombinante humana
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-PCR
<b>SCID</b>	Síndrome da imunodeficiência combinada severa
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TG</b>	Terapia gênica
<b>TGF-β1</b>	Transforming growth factor β1
<b>TMO</b>	Transplante de medula óssea
<b>TRE</b>	Terapia de reposição enzimática
<b>UDPGlcNac</b>	Uridina difosfato N-acetilglicosamina
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Diferentes vias de degradação nos lisossomas.

**Figura 2** - Estrutura esquemática da membrana lisossomal: funções hidrolíticas.

**Figura 3** - Biossíntese e transporte das enzimas lisossomais aos lisossomas.

**Figura 4** - Estrutura dos receptores à manose-6-fosfato (MPR).

**Figura 5** - Catabolismo dos heparan-sulfatos no lisossoma e os tipos de mucopolissacarídeos associados.

**Figura 6** - Catabolismo dos dermatan-sulfatos no lisossoma e os tipos de mucopolissacarídeos associados.

**Figura 7** - Exemplo de depósito lisossomal no cérebro de camundongo MPS I.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1** - Classificação das mucopolissacarídeos (MPS).

**Quadro 1** - Estrutura das diferentes cadeias de glicosaminoglicanos (GAG).

**Quadro 2** – Métodos físicos de terapia gênica com vetores não-virais.

**Quadro 3** - Métodos químicos de terapia gênica com vetores não-virais.

## RESUMO

As mucopolissacaridoses (MPS) constituem um subgrupo de doenças lisossomais de depósito, causadas pela deficiência em uma enzima lisossomal envolvida no catabolismo de glicosaminoglicanos. A ausência de degradação destas moléculas leva ao seu acúmulo nos lisossomas, conduzindo a um processo de dano ou degeneração celular. A maior parte das MPS apresenta desordens neurológicas. As formas severas de MPS I [défice em  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA)] caracterizam-se por manifestações neurológicas severas. Atualmente, as abordagens terapêuticas para MPSI resumem-se ao transplante de medula óssea (TMO) e à terapia de reposição enzimática (TRE). O TMO haplo-idêntico ou geno-idêntico pode desacelerar ou mesmo parar o processo patológico, inclusive a neurodegeneração. As taxas de mortalidade e morbidade, entretanto, são elevadas. A TRE não é eficaz contra o comprometimento do sistema nervoso central (SNC), já que a enzima não pode atravessar a barreira hemato-encefálica. As lesões de depósito lisossomal são difusas por todo o SNC. Assim, o objetivo é fornecer a enzima para todo ou quase todo o encéfalo. Isto pode ser alcançado através de terapia gênica *in situ*, injetando vetores virais diretamente no parênquima cerebral, através de método estereotáxico, criando assim uma fonte intracerebral da enzima. Os vetores derivados de vírus adeno-associados (AAV) são capazes de transduzir os neurônios e as células gliais do SNC. Neste trabalho, nós apresentamos um protocolo pré-clínico de terapia gênica com vetor AAV2.5-IDUA injetado via intra-estriatal, bilateralmente, em camundongos com 6 semanas de vida. Nossos resultados indicam que a transferência gênica induz uma expressão persistente de IDUA nas células e leva à reversão das lesões de depósito lisossomal na quase-totalidade do SNC. Assim, nós demonstramos a eficácia e a viabilidade desta abordagem terapêutica na correção e/ou prevenção das manifestações do SNC em um modelo murino de MPSI. Assim, sugerimos que a associação deste protocolo de terapia gênica com uma terapia sistêmica (ERT ou TMO), em idade precoce, poderia ser uma abordagem terapêutica adequada e eficaz para o tratamento global da MPSI.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis (MPS) is a type of lysosomal storage disease, caused by a deficiency in lysosomal enzymes involved in glycosaminoglycan catabolism. The absence of degradation of these molecules leads to cellular damage or degeneration process. The majority of MPSs shows neurological disorders. Severe forms of MPSI (deficiency in  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA)) are characterized by severe neurological manifestations. Currently, therapeutic approaches for MPSI are limited to bone marrow transplantation (BMT) and enzyme replacement therapy (ERT). Haplo-identical or geno-identical BMT is able to slow or stop the pathological process, including neurodegeneration. However, mortality and morbidity rates are high. The ERT is not efficient to correct or prevent central nervous system (CNS) damage, since the enzyme is not able to cross the blood-brain barrier. Storage lesions could be diffusely found in all CNS. Thus, the aim is the widespread delivery of the enzyme for the whole brain. This can be reached through in situ gene therapy, by injecting viral vectors directly in brain parenchyma, through stereotaxical methods, creating a brain source of the enzyme. AAV vectors are able to transduce neurons and glial cells of the CNS. In the present work, we have established a gene-therapy pre-clinical protocol with AAV2.5-IDUA vector which have been administered bilaterally in the striatum of 6-weeks old mice. Our results indicate that gene transfer leads to persistent IDUA expression in the cells and to the reversion of storage lesions in almost all the CNS. We have demonstrated the effectiveness and viability of this therapeutic approach in the correction or prevention of storage lesions in the MPSI mice brain. Thus, we suggest that the association of this gene therapy protocol with systemic therapy (ERT or BMT), in early age, could be an adequate and effective therapeutic approach to the global treatment of MPSI.

## RESUME

Les mucopolysaccharidoses (MPS), un sous-groupe des maladies de surcharge lysosomale, sont causées par le déficit d'une enzyme lysosomale intervenant dans le catabolisme des glycosaminoglycanes. L'absence de dégradation de ces molécules entraîne leur accumulation dans les lysosomes conduisant à une souffrance cellulaire. La plupart des MPS s'accompagnent de désordres neurologiques. Les formes sévères de MPS I (déficit en  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA)) se caractérisent par des manifestations neurologiques sévères. Actuellement, les approches thérapeutiques pour les MPSI s'agissent de la greffe de moelle osseuse (GMO) ou de l'injection d'enzyme purifiée (TRE). La greffe de moelle osseuse haplo-identique et géno-identique peut stopper le processus de la maladie y compris la neurodégénérescence mais les taux de mortalité et de morbidité sont élevés. L'enzymothérapie substitutive n'est pas efficace contre les atteintes du système nerveux central (SNC) car l'enzyme ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Les lésions de surcharge lysosomale étant diffuses dans tout le SNC, l'objectif est d'apporter l'enzyme dans la totalité de l'encéphale. Ceci peut se concevoir grâce à la thérapie génique *in situ* en injectant des vecteurs viraux directement dans le parenchyme cérébral par une méthode stéréotaxique, créant ainsi une source intracérébrale d'enzyme. Les vecteurs AAV sont capables de transduire les neurones et les cellules gliales du SNC. Dans ce travail nous présentons un protocole pré-clinique de thérapie génétique avec des vecteurs AAV2.5-IDUA injectés dans le striatum des souris âgées de 6-semaines. L'injection a été bilatérale. Nos résultats indiquent que le transfert de gène induit une expression persistante de l'IDUA dans les cellules et entraîne une disparition des lésions de surcharge. Nous avons démontré l'efficacité et faisabilité de cette approche thérapeutique pour traiter les lésions de surcharge dans le cerveau des souris MPSI. Ainsi, nous proposons l'association de ce protocole de thérapie génique avec une thérapie systémique (TRE ou GMO), dans un âge précoce, comme une approche thérapeutique adéquate et efficace pour le traitement global du MPS I.

**CAPÍTULO I**  
**- INTRODUÇÃO -**



A mucopolissacaridose tipo I (MPSI) faz parte do grupo das mucopolissacaridoses, doenças lisossomais de depósito (DLD) que envolvem deficiências na cascata do catabolismo de glicosaminoglicanos (GAGs). Assim, a Parte I desta introdução consta de uma revisão sobre o lisossoma, detalhando sua estrutura e função; e sobre os glicosaminoglicanos, abordando seus aspectos estruturais, funcionais e metabólicos, com ênfase nos dois glicosaminoglicanos envolvidos na MPSI, o heparan e o dermatan sulfato. Com isso, espera-se criar subsídios para que os mecanismos fisiopatológicos da MPSI possam ser mais bem compreendidos. Em seguida, a Parte II aborda as doenças metabólicas hereditárias, aprofundando-se, dentre estas, nas doenças lisossomais de depósito, sobretudo na MPSI. E, finalmente, a Parte III fornece um panorama das abordagens terapêuticas para as mucopolissacaridoses.

Neste contexto, o objetivo desta tese se apresenta focado na terapia celular baseada em células-tronco mesenquimais (MSC) e, neste âmbito, na biodistribuição das MSCs (capítulo II); na descrição qualitativa do quadro patológico da MPSI em nível do sistema nervoso central e, finalmente, no desenvolvimento de um protocolo pré-clínico de terapia gênica baseada em vetores adeno-associados (capítulo III).

## PARTE I – BASES BIOQUÍMICAS

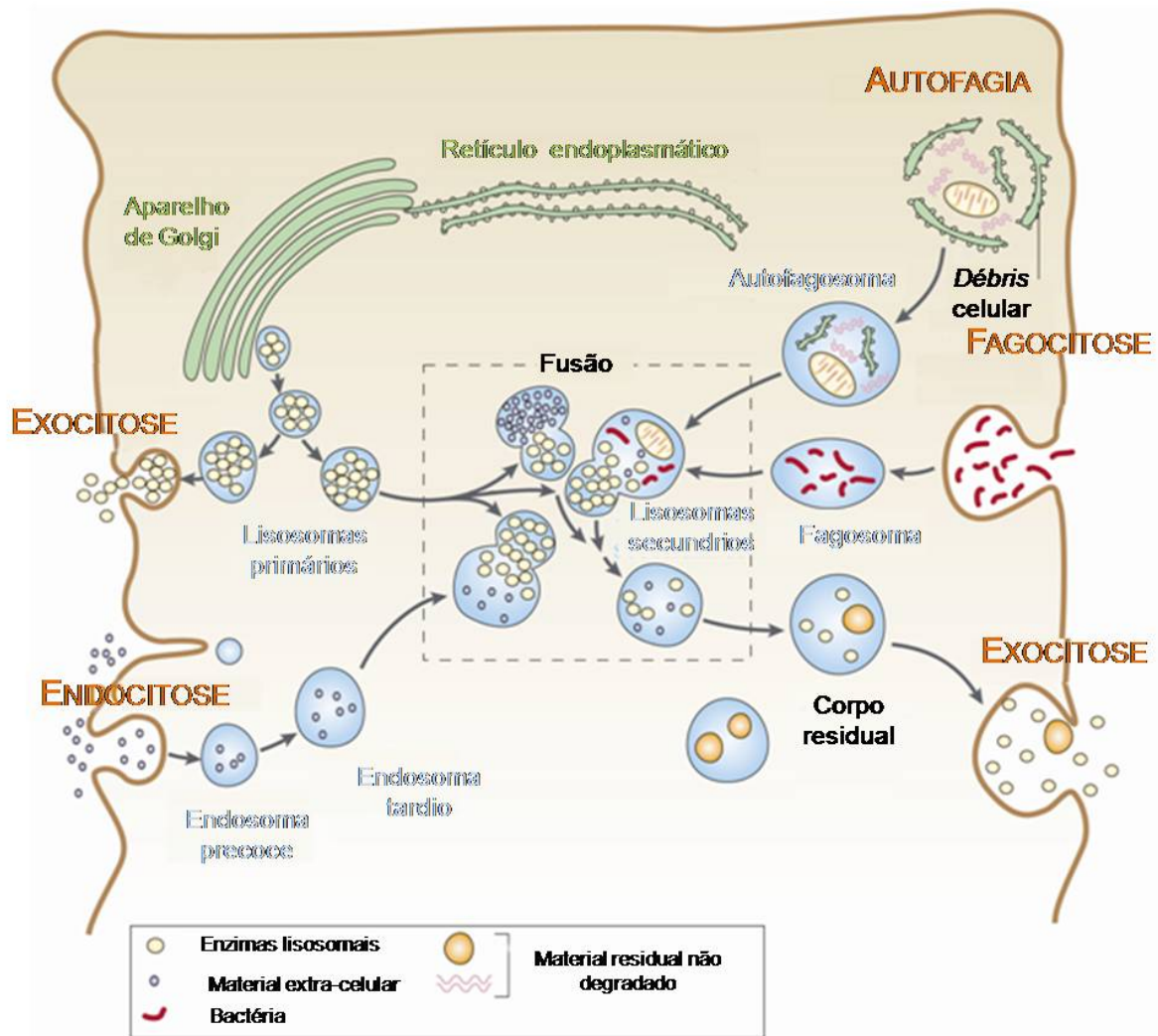
### 1. O LISOSSOMA

O lisossoma, do grego *lúsis*, dissolução, e *soma*, corpo, é definido como uma organela intra-citoplasmática de membrana simples, presente em todas as células nucleadas. Ele se distingue dos endosomas pela ausência de dois receptores à manose-6-fosfato (Alberts *et al.*, 1994).

Constitui um dos principais sítios de degradação celular de macromoléculas em subunidades monoméricas reutilizadas pela célula. Morfologicamente, o lisossoma é uma organela bastante heterogênea, com tamanho que pode variar de 0,05 a 5 µm. Seu aspecto depende do seu contexto tecidual, da sua origem e do seu modo de funcionamento. Tal variabilidade morfológica deve-se a seus diferentes estágios de maturação e estado funcional (fagossoma ou pré-lisossoma, lisossoma primário, lisossoma secundário, lisossoma terciário ou corpo residual) (figura 1). Os lisossomas secundários são capazes de atuar sozinhos na degradação de macromoléculas (Alberts *et al.*, 1994; Desnick and Schuchman, 2002).

O lisossoma é o compartimento responsável pela degradação final de constituintes provenientes da: 1) via endocítica, no caso de material captado do meio extracelular (Kornfeld and Mellman, 1989); 2) fagocitose, no caso de destruição de grandes partículas englobadas (Funato *et al.*, 1997); 3) autofagia, no caso da digestão dos próprios componentes celulares (Lawrence and Brown, 1992); 4) crinofagia, no caso de regulação da secreção endócrina e exócrina (Noda and Farquhar, 1992); e 5) da proteólise de proteínas citoplasmáticas parcialmente degradadas pelo proteossoma e portadoras de uma sequência de sinal (KFERQ). Estas proteínas citoplasmáticas são transportadas através da membrana lisossomal por um mecanismo, via transportador (proteínas ABC, sítio de ligação ao ATP) (Cuervo and Dice, 1996) (figura 1). Os lisossomas estão igualmente envolvidos em uma série de outros fenômenos celulares, tal como a proteólise de proteínas imunogênicas (as moléculas de MHC classe II) (Marks *et al.*, 1995), a remodelagem óssea (Saftig *et al.*, 2000) e a regulação de fatores de crescimento e de colesterol; e a produção de hormônios e vitaminas (Renfrew and Hubbard, 1991).

A digestão de macromoléculas, que ocorre na luz lisossomal, é catalisada por um grande número de enzimas que atuam em pH ácido (pH próximo de 5). A degradação lisossomal é crucial em vários processos fisiológicos, incluindo a renovação de proteínas celulares normais, a eliminação de proteínas anormais, a regulação negativa dos receptores localizados na superfície celular, a liberação de nutrientes endocitados e a inativação de organismos patogênicos. Ele atua também na homeostasia de íons metálicos e na reparação da membrana plasmática (Alberts *et al.*, 1994; Desnick and Schuchman, 2002).



**Figura 1: Diferentes vias de degradação nos lisossomas (adaptado de Desnick and Schuchman, 2002).**

Cada via de degradação leva à digestão intracelular de materiais derivados de diferentes vias. Moléculas extracelulares que devem ser catabolizadas são internalizadas na célula por endocitose ou fagocitose, segundo o tamanho da molécula em questão. Outro tipo de endocitose, a pinocitose, é possível devido à presença de receptores celulares específicos. Esta via constitui o mecanismo de transporte, através da membrana, utilizado para a internalização de hormônios, fatores de crescimento, vírus e toxinas. A autofagia corresponde à via de degradação dos próprios componentes celulares. A crinofagia, que ocorre no lisossoma de células secretoras das glândulas endócrinas, permite a eliminação de produtos secretados em excesso. Todas essas vias convergem para o lisossoma, cujo conteúdo é finalmente degradado.

## 1.1 PROTEÍNAS LISSOSSOMAIS DE MEMBRANA

A membrana lisossomal, constituída de uma simples camada fosfolipídica, tem como principal função a regulação da saída de metabólitos gerados pela digestão de macromoléculas, que ocorre na luz do lisossoma. O transporte destes produtos da digestão ocorre seja por difusão passiva, seja por um transportador específico do substrato. A membrana lisossomal é, em geral, impermeável às macromoléculas e aos produtos intermediários da digestão, mas algumas moléculas pequenas de até cerca de 200Da, assim como moléculas lipossolúveis, podem atravessá-la livremente (Alberts *et al.*, 1989).

A membrana possui características importantes que a permite: manter o sistema fechado, a fim de impedir que as hidrolases lisossomais alcancem o citosol; permitir a saída dos produtos resultantes da digestão ocorrida no interior do lisossoma para o citoplasma; manter o pH ácido para o bom funcionamento das enzimas lisossomais; e proteger-se da digestão pelas enzimas nele contidas. Para isso, a membrana lisossomal contém uma série de proteínas de membrana que garantem estas funções (Winchester, 2001b). Estes elementos são constantes em todos os lisossomas, e apenas a natureza das enzimas varia de um tipo celular a outro.

Entre os elementos constituintes da membrana estão as proteínas integrais, altamente glicosiladas, denominadas LAMP (*Lysosome-associated membrane proteins*) (LAMP-1, LAMP-2 e CD63/LAMP-3), LIMP (*lysosome integral membrane proteins*) ou Igps (Igp-A e Igp-B), que protegem a membrana contra as enzimas e o pH ácido, neste caso, graças aos seus açúcares expostos na direção da luz lisossomal. Os receptores específicos da membrana, LAMP-2 e Lgp96, ubiquitinilados, são destinados a capturar as proteínas que devem ser degradadas nos lisossomas. Assim como a membrana plasmática, a membrana lisossomal é constituída principalmente por fosfolipídeos. A fração lipídica é mais rica em colesterol e em esfingomiéline do que a da membrana do retículo endoplasmático ou dos sacúolos golgianos. Ela contém, igualmente, porinas, que permitem o trânsito dos produtos finais da digestão intra-lisossomal, através da membrana, para o citosol, onde são reutilizados pela célula; e bombas de prótons (H<sup>+</sup>/ATPases), ancoradas na membrana, que criam e mantêm o ambiente ácido necessário para a digestão intra-lisossomal. Seu papel é transportar os íons H<sup>+</sup> do

citosol para a luz do lisossoma. Este transporte ocorre via ATP, que fornece a energia necessária para o funcionamento da bomba. Os lisossomas não possuem nenhum dos dois receptores da manose-6-fosfato, cátion dependente (CD) ou cátion independente (CI), o que os distingue dos endosomas tardios.

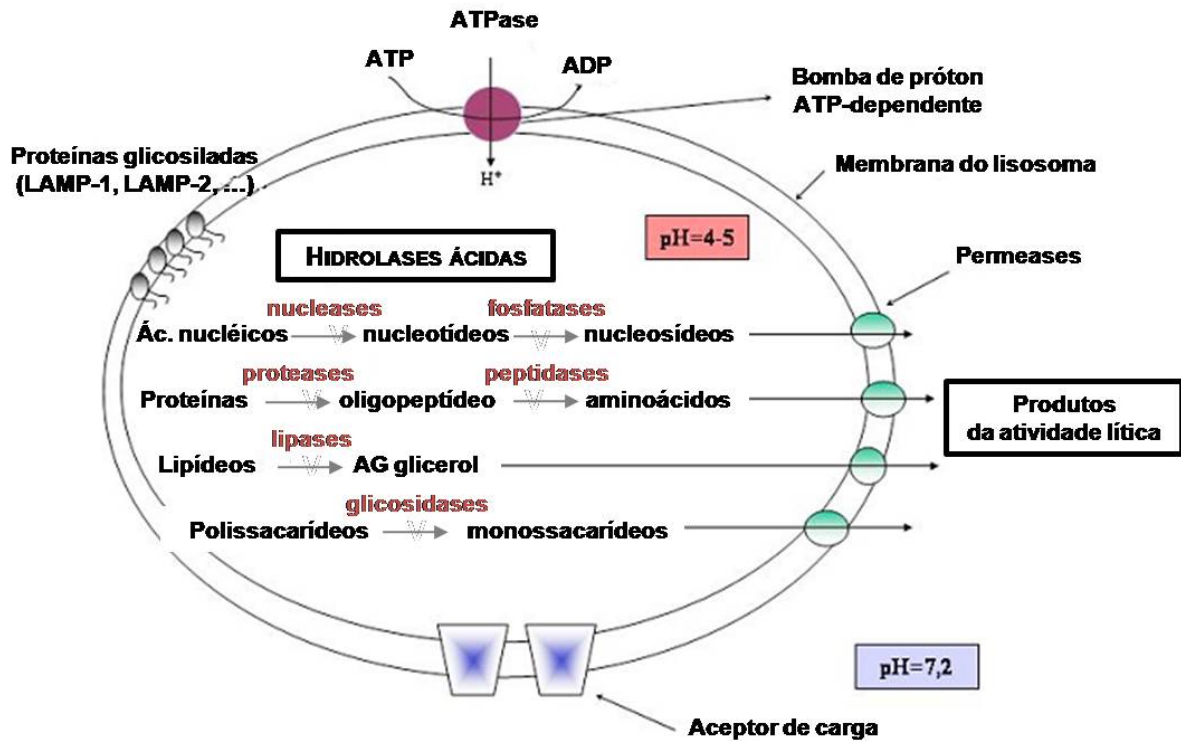
As proteínas LAMP-1 (Meikle *et al.*, 1997) e LAMP-2 (Hua *et al.*, 1998) são objeto de estudos de pesquisa diagnósticas de doenças de depósito lisossomal.

## 1.2 AS ENZIMAS LISSOSSOMAIS

Os lisossomas contêm mais de 50 enzimas catalíticas, incluindo proteases, nucleases, glicosilases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases. Estas enzimas são capazes de degradar a maioria das macromoléculas. São todas hidrolases ácidas, cuja atividade ótima, a um pH entre 4 e 5 na luz lisossomal, é regulada pelas bombas de próton. A maioria destas hidrolases é solúvel, mas algumas delas, como a  $\beta$ -glucocerebrosidase, podem estar ligadas às membranas (Alberts *et al.*, 1994; Desnick and Schuchman, 2002).

O bom funcionamento do lisossoma é um elemento essencial para o metabolismo celular. Uma disfunção lisossomal leva ao acúmulo de macromoléculas ou de intermediários metabólicos, provocando manifestações clínicas variáveis e freqüentemente graves. Estas doenças são classificadas genericamente como doenças de depósito lisossomal (Alberts *et al.*, 1994).

As enzimas lisossomais são glicoproteínas que possuem cadeias oligossacarídicas N-ligadas e às vezes O-ligadas. As cadeias glicídicas podem se ligar a uma proteína seja por ligações ao N (ao átomo de nitrogênio de um resíduo asparigina), seja por ligações ao O (ao átomo de oxigênio de um resíduo serina ou treonina). Estas hidrolases desempenham um importante papel no catabolismo de proteínas, de lipídeos e de glicídeos, e participam na digestão de micro-organismos e macromoléculas (figura 2). A maturação das enzimas lisossomais ocorre por uma série de sinais de reconhecimento desde o sítio onde são sintetizadas, o retículo endoplasmático rugoso (RER), até o seu destino final, os lisossomas. Estas reações químicas e biológicas são detalhadas em diversas revisões (Marzella and Glaumann, 1983; Kornfeld, 1986; von Figura and Hasilik, 1986; Kornfeld, 1987; Méresse *et al.*, 1993; Desnick and Schuchman, 2002).



**Figura 2: Estrutura esquemática da membrana lisossomal: funções hidrolíticas.**

### 1.2.1 BIOGÊNESE DAS ENZIMAS LISSOSSOMAIS

#### Cadeias polipeptídicas

A biogênese e a translocação das enzimas lisossomais, assim como de proteínas secretadas e de proteínas de membrana, apresentam características comuns. De fato, as proteínas são sintetizadas nos ribossomas, associados à membrana do RER, e as cadeias nascentes apresentam um peptídeo sinal em N-terminal (cerca de 20 aminoácidos), que inicia o transporte vetorial do polipeptídeo nascente da membrana do RER para a luz desta organela. O peptídeo sinal é clivado por uma peptidase situada na face interna da membrana do RER (Alberts *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1998).

Durante este percurso, as proteínas sofrem várias transformações: clivagem do peptídeo sinal; seguida da adição de cadeias oligossacarídicas e suas modificações no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi; e, enfim, formação de pontes di-sulfídicas e dobramento da proteína (Alberts *et al.*, 1994).

### Cadeias oligossacarídicas

#### ► Glicosilação de proteínas no RER:

A biogênese das cadeias oligossacarídicas das enzimas lisossomais ocorre no RER e no aparelho de Golgi (figura 3a e b). As enzimas lisossomais, assim como as proteínas secretadas e de membrana, sofrem glicosilação co-traducional em certos resíduos de asparagina. Esta etapa de N-glicosilação consiste na adição de oligossacarídeos, pela transferência em bloco de um oligossacarídeo rico em manose formada de 14 resíduos glicídicos (2 resíduos N-acetilglicosamina (GlcNac), 9 resíduos manose e 3 resíduos glicose) ligados a uma molécula lipídica doadora, o dolicol fosfato, localizado na membrana do RER (figura 3b etapa 1'). Esta transferência de oligossacarídeo é catalizada por uma glicotransferase. O complexo enzimático, responsável por este transporte, reconhece as seqüências de aminoácidos nas enzimas lisossomais recém sintetizadas, que são asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina. Em seguida, ainda no RER, são retirados 3 resíduos glicose e um dos resíduos manose do oligossacarídeo do polipeptídeo através da ação de glucosidases I e II e da  $\alpha$ -manosidase (figura 3b etapa 2'). A cadeia oligossacarídica em formação sofre uma alteração conformacional mediada por proteínas chaperonas, que se associam transitoriamente às proteínas recém-sintetizadas (Desnick and Schuchman, 2002).

#### ► Modificação das cadeias oligossacarídicas no aparelho de Golgi:

Após sua síntese no RER, as proteínas são transportadas para o aparelho de Golgi através de um transporte vesicular (figura 3b etapa 3 '). As enzimas lisossomais diferenciam-se das proteínas secretadas e das proteínas integrantes da membrana plasmática pela aquisição de resíduos manose-6-fosfato. As proteínas secretadas e as proteínas de membrana perdem a maior parte dos resíduos manose e formam estruturas ditas complexas (figura 3b etapa 4 '). Uma pequena fração das cadeias oligossacarídicas das enzimas lisossomais é transformada em estrutura complexa. Esta aquisição de resíduos fosfomanosil é assegurada pela ação de duas enzimas distintas. A fosforilação ocorre em uma hidroxila do carbono de um ou vários resíduos manose dos oligossacarídeos (Alberts *et al.*, 1994; Desnick and Schuchman, 2002).



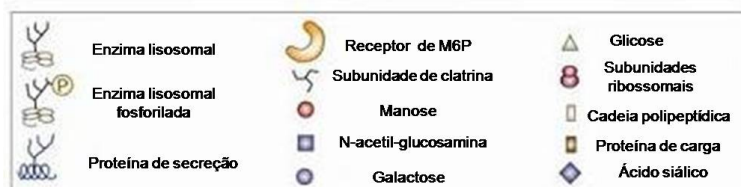
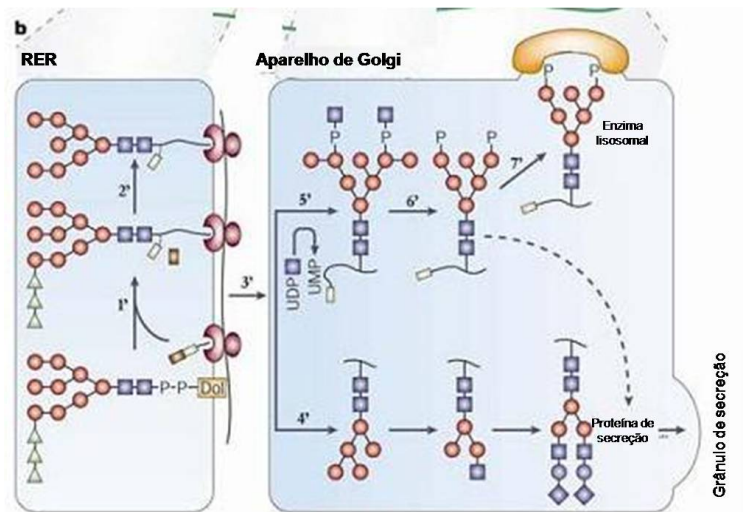
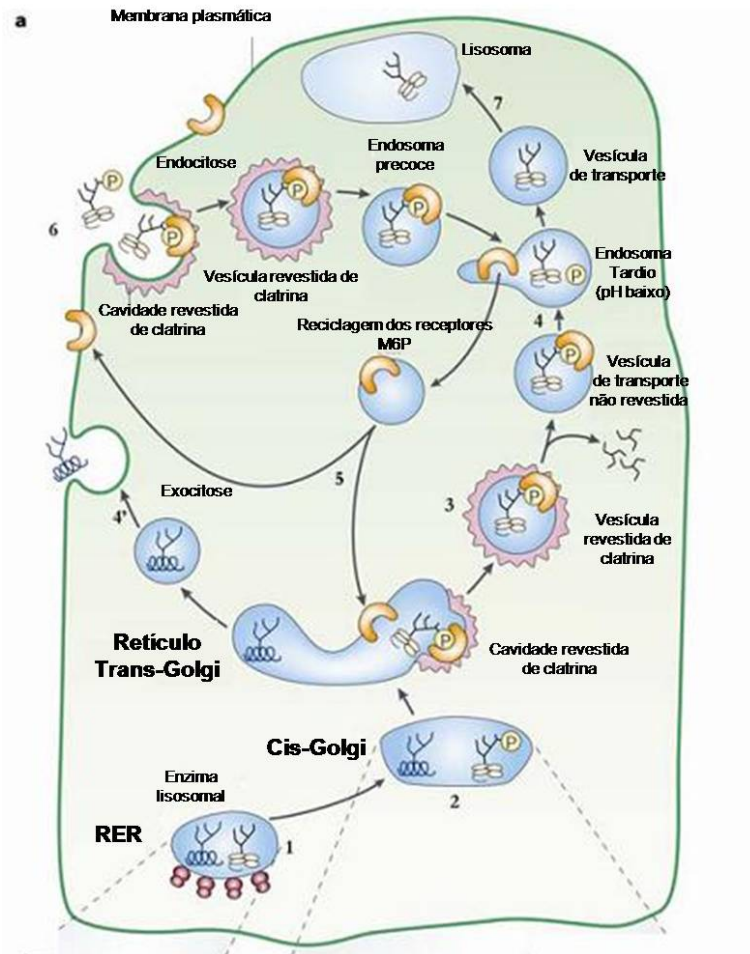
A enzima lisossomal N-acetilglucosamina-fosfotransferase transfere um resíduo N-acetilglucosamina 1-fosfato a partir do UDPGlcNac (uridina difosfato N-acetilglucosamina) sobre certos resíduos manose das enzimas lisossomais, gerando um intermediário fosfodiéster (figura 3b etapa 5'). Em seguida, a N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosamina elimina o resíduo N-acetilglucosamina, liberando um resíduo manose-6-fosfato (figura 3b etapa 6'). Os resíduos fosfomanose servem assim de sinal de reconhecimento das enzimas lisossomais aos receptores presentes no aparelho de Golgi. Este complexo receptor-ligante permite o endereçamento das hidrolases aos lisossomas (figura 3a etapa 3) (Desnick and Schuchman, 2002).

Uma deficiência de fosfotransferase leva à ausência de fosforilação das enzimas lisossomais, e estas são então secretadas no meio extracelular. Esta deficiência é responsável pelas mucopolidoses de tipo II ou III. Nos pacientes afetados por estas doenças, uma quantidade importante de enzima é encontrada no soro e no meio de cultura de seus fibroblastos (Alberts *et al.*, 1994).

► Transporte das enzimas lisossomais aos lisossomas:

O transporte deste complexo passa por compartimentos intermediários, vesículas de clatrina e endosomas (figura 3b etapa 7' e figura 3a). Nos endosomas, que são compartimentos ácidos, o receptor dissocia-se do ligante (figura 3a etapa 4) para, em seguida, ser reciclado no aparelho de Golgi e endereçado à membrana plasmática (figura 3a etapa 5). As enzimas lisossomais assim liberadas são dirigidas aos lisossomas (figura 3a etapa 7). Uma vez nos lisossomas, sofrem hidrólise da manose-6-fosfato e proteólise limitada, a fim de formar as espécies moleculares ativas. Contudo, uma pequena fração das hidrolases ácidas, cerca de 5 a 20%, é excretada antes de chegar aos lisossomas (figura 3a etapa 6). Uma porção destas enzimas pode fixar-se aos receptores da manose-6-fosfato presentes na superfície celular das células vizinhas e serem reinternalizadas por endocitose e, então, conduzidas aos lisossomas (figura 3a etapa 6). Este mecanismo de secreção-recaptura das enzimas lisossomais é base do fundamento da correção cruzada observada quando células deficitárias são co-cultivadas com células normais (Neufeld and Fratantoni, 1970).

Outra via alternativa de endereçamento das enzimas lisossomais aos lisossomas, independente de sinal de reconhecimento, foi sugerida. A descoberta deste indicador, que é próprio às hidrolases ácidas, e da presença de receptores específicos, pôde ser destacada graças a estudos *in vitro* por Neufeld and Cantz em 1971 (Neufeld and Cantz, 1971). Com efeito, fibroblastos normais secretavam “um fator de correção”, que endocitado por fibroblastos que provêm de pacientes MPS, conduzia assim a um restabelecimento do catabolismo dos glicosaminoglicanos. Além da descoberta “de um fator de correção”, estas experiências permitiram destacar um processo de secreção-recaptura.



**Figura 3: Biossíntese e transporte das enzimas lisossomais aos lisossomas (adaptado de Desnick and Schuchman, 2002).**

- (a) 1: tradução de proteínas, a partir de RNA mensageiro, no retículo endoplasmático; 2: no aparelho de Golgi : glicosilação et síntese de marcadores de reconhecimento à manose-6-fosfato ; 3: transporte ao lisossoma mediante o receptor de manose-6-fosfato, passando por compartimentos intermediários (vesículas de clatrina e endosomas ; 4: as enzimas são liberadas de seus receptores em meio ácido ; 5: os receptores são reciclados, sendo redirecionados ao aparelho de Golgi ou à membrana plasmática; 6: cerca de 10% das enzimas lisossomais são normalmente excretadas no meio extracelular e podem ser internalizadas por endocitose pelas células vizinhas, graças à presença de receptores à manose-6-fosfato na superfície destas células; 7: transporte das enzimas aos lisossomas.
- (b) no RER, 1': glicosilação das enzimas lisossomais pela transferência em bloco de um oligossacarídeo ligado ao dolichol ; 2': perda de 3 resíduos glicose e um resíduo manose; 3': transporte das enzimas no aparelho de Golgi; 4': separação das enzimas lisossomais das proteínas de secreção e das proteínas da membrana plasmática; 5' e 6': aquisição do sinal de reconhecimento à manose-6-fosfato pela ação sequencial da fosfotransferase e da fosfodiesterase; 7': as enzimas fosforiladas ligam-se aos receptores à manose-6-fosfato associados às vesículas de clatrina que brotam da membrana do aparelho de Golgi. M6P: manose-6-fosfato; RER: retículo endoplasmático rugoso.

### 1.2.2 OS RECEPTORES MANOSE-6-FOSTATO

Dois receptores distintos são capazes de se ligar ao indicador de reconhecimento à manose-6-fosfato das enzimas lisossomais (figura 4). Ambos são glicoproteínas transmembranares de tipo I (Ghosh *et al.*, 2003). Estão localizados na rede trans-goliana, nos endosomas precoces e tardios e ao nível da membrana plasmática, mas estão ausentes nos lisossomas.

#### Estrutura e localização

O primeiro receptor identificado, o receptor de manose-6-fosfato cátion-independente (CIMPR ou grande receptor), tem uma massa molecular de 215 kDa e está presente na membrana sob a forma de dímero. O CIMPR não necessita de cátions para fixar o seu ligante, e esta fixação ocorre em pH neutro. Esta ligação a pH neutro é primordial nas terapias por substituição enzimática (Alberts *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 2003).

O segundo receptor identificado, o receptor de manose-6-fosfato cátion-dependente (CD-MPR ou pequeno receptor), tem uma massa molecular de 45 kDa. Necessita de cátions divalentes para a fixação do ligante (Alberts *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 2003).

A comparação das sequências destes dois receptores revela que são aparentados. Com efeito, foram descritas certas similaridades estruturais no seu domínio extra-citoplasmático, responsável pela fixação do ligante. Os domínios transmembranares e citoplasmáticos não mostram similaridade de sequência evidente, o que não exclui a possível similaridade na sua estrutura tridimensional (Alberts *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 2003).

### Funções

Estes dois receptores possuem uma forte afinidade para oligossacarídeos que contêm dois resíduos fosfomanosil. O CIMPR contém dois sítios de ligação para a manose-6-fosfato, enquanto que o CD-MPR tem apenas um por subunidade, por conseguinte cada receptor fixa uma hidrolase. Ambos se ligam às enzimas lisossomais recém-sintetizadas e transportam-nas da rede trans-golgiiana para os endosomas precoces, o que implica a mobilização de vesículas de clatrina. Esta ligação manose-6-fosfato-MPR ocorre à pH 7 na rede trans-golgiiana. O pH ácido dos endosomas (pH 6) provoca a dissociação das hidrolases ácidas dos receptores. Estes receptores são, em seguida, reciclados entre os diferentes compartimentos intracelulares, o aparelho de Golgi, os endosomas e a membrana plasmática, graças a sinais moleculares presentes no seu domínio citoplasmático (Ghosh *et al.*, 2003).

O CIMPR é um receptor multifuncional que executa várias funções essenciais à função celular normal, enquanto que o CD-MPR executa apenas uma, a de enviar as hidrolases ácidas recém-sintetizadas da rede trans-golgiiana aos lisossomas.

Além da fixação das enzimas lisossomais, o CIMPR está envolvido em vários outros processos fisiológicos. Este receptor, presente na superfície celular, liga e internaliza o fator de crescimento IGF-II (Insulin-like Growth Factor II) para que este último seja degradado nos lisossomas. O papel deste receptor seria, por conseguinte, modular os níveis extra-citoplasmáticos deste hormônio, sobretudo durante o desenvolvimento embrionário (Ghosh *et al.*, 2003).

Esta ligação ocorre em um sítio distinto do das enzimas lisossomais. Ele intervém igualmente na fixação de outros ligantes que contêm um resíduo manose-6-fosfato (o precursor de TGF- $\beta$ 1 [Transforming Growth Factor- $\beta$ 1], Ganzima A e B, a proliferina, o factor LIF [Leukemia Inhibitory Factor], o EGF [Epidermal Growth

Factor]), ou não (o plasminogênio, o ácido retinóico, o plasminogênio tipo uroquinase [uPAR]) (Ghosh *et al.*, 2003; Hawkes and Kar, 2004).

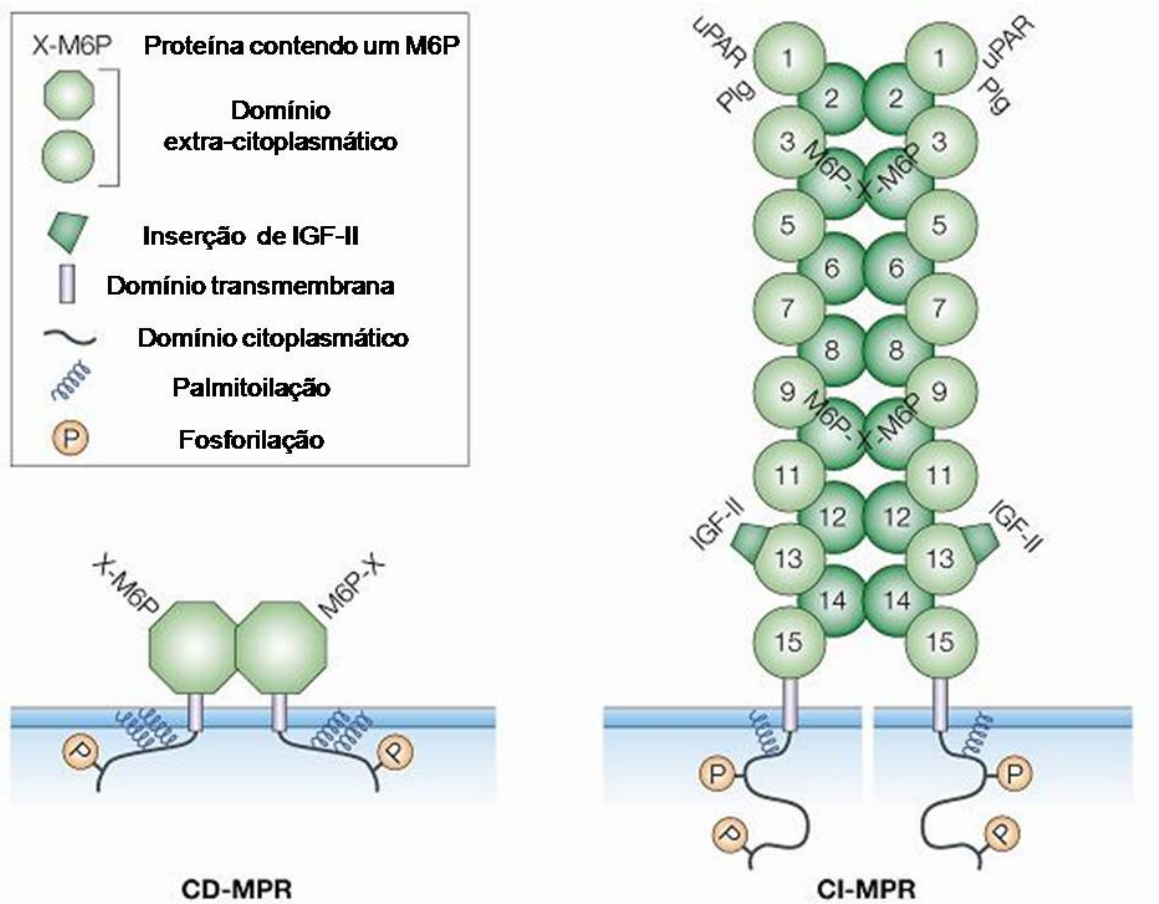
O CIMPR, mais do que o CD-MPR, intervém igualmente na liberação das enzimas lisossomais recém-sintetizadas e na endocitose das enzimas fosforiladas presentes no meio extracelular. Células em cultura desprovidas deste receptor, mas não de CD-MPR, secretam 70% das hidrolases recém-sintetizadas. A presença de CIMPR corrige esta hipersecreção. Em contrapartida, o CD-MPR não atua na endocitose das hidrolases ácidas exógenas. Camundongos *knockout* (KO) deficitários em CD-MPR são viáveis e não apresentam sinais clínicos característicos. Mas, níveis elevados de enzimas lisossomais fosforiladas no seu plasma foram observados. Além disso, os fibroblastos em cultura provenientes destes animais mostram igualmente uma taxa elevada de enzimas lisossomais fosfatadas tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Isto sugere que este receptor é eficaz para o tráfego intracelular das hidrolases, mas não para a sua endocitose quando estão no meio extracelular (Stein *et al.*, 1987; Ludwig *et al.*, 1993). O CIMPR poderia ter um efeito compensador quando de uma deficiência no outro receptor, CD-MPR, in vivo (Sleat and Lobel, 1997). Porém, uma deficiência dos dois receptores em fibroblastos embrionários de camundongos mostra que mais de 85% das enzimas lisossomais estão presentes no meio extracelular, mas a restauração de um ou do outro receptor não é suficiente para uma seleção completa das enzimas destinadas aos lisossomas (Kasper *et al.*, 1996; Munier-Lehmann *et al.*, 1996).

### 1.2.3 VIAS INDEPENDENTES DE MANOSE-6-FOSFATO

Embora estes dois receptores desempenhem um papel essencial no transporte intracelular das enzimas lisossomais recém sintetizadas, vários estudos sugerem que existam mecanismos alternativos ou adicionais, independentes do reconhecimento da manose-6-fosfato, que permitem o transporte das enzimas lisossomais aos lisossomas (Kornfeld, 1986; von Figura and Hasilik, 1986; Kornfeld, 1987; Rijnboutt *et al.*, 1991; Dittmer *et al.*, 1999).

Duas enzimas lisossomais, a fosfatase ácida e a  $\beta$ -cerebrosidase, permitem compreender este mecanismo independente de manose-6-fosfato, já que ambas, não fosforiladas, são eficientemente dirigidas aos lisossomas e apresentam

atividade normal (Kornfeld and Mellman, 1989). A fosfatase ácida é dirigida ao lisossoma via membrana plasmática e a  $\beta$ -cerezobrosidase é ligada às membranas, mas não é dirigida por receptores específicos. Por conseguinte, deve haver outros receptores. De fato, a presença de outros açúcares sobre as enzimas lisossomais em certos tipos celulares pode ser reconhecida por outros receptores como o receptor à N-acetilgalactosamina, à N-acetilglucosamina, à asialoglicoproteína (hepatócitos), à manose (células do sistema reticulo-endotelial (monócitos, macrófagos, células de Kupffer e microglia) e à fucose (hepatócitos) (Drickamer, 1991). Ao contrário dos MPRs, estes receptores não são ubiqúitários, mas sim tecido-específicos. Esta via alternativa pode implicar no sistema de secreção-recaptura por outros receptores ou na transferência direta de célula a célula das enzimas lisossomais por um sistema de poros (Dittmer *et al.*, 1999).



**Figura 4: Estrutura dos receptores à manose-6-fosfato (MPR) (adaptado de Ghosh et al., 2003).**

Os receptores à manose-6-fosfato (MPR) são glicoproteínas transmembrana de tipo I. O MPR cátion-dependente (CD-MPR) (46kDa) é um homodímero e possui um único sítio de ligação à manose-6-fosfato pelo polipeptídeo. O MPR cátion-independente (CIMPR) (300kDa) é um dímero na membrana. Este receptor não necessita de cátion para se fixar ao ligante e possui dois sítios de ligação à manose-6-fosfato. Estes receptores são formados por uma seqüência sinal amino-terminal (28 aminoácidos para o CD-MPR e 44 para o CIMPR) e um domínio extra-citoplasmático de fixação ao ligante (159 resíduos para o CD-MPR e 163 para o CIMPR).

O CIMPR é igualmente um receptor de IGF II. Ele atua na retenção das hidrolases no meio intracelular, enquanto o CD-MPR está mais implicado na secreção dessas hidrolases. Ocorrem diversas modificações pós-traducionais dos MPR, incluindo palmitoilação e fosforilação. uPAR, receptor à uroquinase (ativador de plasminogênio); IGF-II, insulin-like growth factor; Plg, plasminogênio.



## 2. Os GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAG), antes denominados mucopolissacarídeos, são polissacarídeos não-ramificados, compostos de cerca de 20 a 200 unidades dissacarídicas repetidas, organizadas em longas cadeias. Devem o seu nome ao fato de um dos dois resíduos glicídicos do motivo dissacarídico ser sempre um glicídeo aminado, a N-acetil-glucosamina (GlcNac) ou o N-acetilgalactosamina (GalNac), que geralmente é sulfatado. O segundo glicídeo é um ácido urônico. São sintetizados no aparelho de Golgi, vinculando-se à proteína sintetizada por um resíduo serina, para formar proteoglicanos, que são transportados em seguida, por exocitose, para fora da célula. Os proteoglicanos são extremamente diversos na sua dimensão, na sua forma e na sua química (Harper *et al.*, 1998).

Distinguem-se quatro grupos de GAGs em função de seus resíduos glicídicos, do seu tipo de ligação, do número e da posição dos grupamentos sulfato: dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), keratan sulfato (KS) e condroitin sulfato (CS). O CS é um poliglicosaminoglicano composto de unidades dissacarídicas repetidas, constituídas de ácido glicurônico e N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina 4- ou 6-sulfato. O DS é um isômero do condroitin sulfato, cujas unidades dissacarídicas são constituídas de ácido  $\alpha$ -L-idurônico ou ácido  $\beta$ -D-glicurônico e N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina 4- ou 6-sulfato. No HS, o dissacarídeo é composto de ácido  $\alpha$ -L-idurônico ou ácido  $\beta$ -D-glicurônico, combinado à acetil- $\alpha$ -D-glucosamina ou à N-sulfo-glucosamina. No KS, as unidades dissacarídicas são constituídas de  $\alpha$ -acetil- $\beta$ -6-glucosamina 6-sulfato e de galactose (quadro 1) (Harper *et al.*, 1998).

No sistema nervoso, a maioria dos proteoglicanos possui cadeias de GAGs que são o CS e o HS (Bandtlow and Zimmermann, 2000). No sistema nervoso central (SNC), os GAGs estão presentes em todos os tipos celulares. Margolis and Margolis mostraram que, em cérebro de bovinos, há uma concentração mais elevada de GAGs nos corpos neuronais. E as concentrações mais fracas aparecem nos oligodendrócitos, representando cerca de um quinto dos valores obtidos nos neurônios (Margolis and Margolis, 1994).

Os GAGs parecem ser distribuídos de maneira ubiqüitária entre as células eucariotas e participam em diversos processos biológicos. Podem formar colóides

cujos poros, de dimensão e densidades variáveis, desempenham o papel de filtros que controlam a passagem de moléculas no meio extracelular.

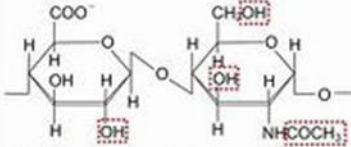
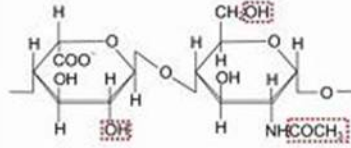
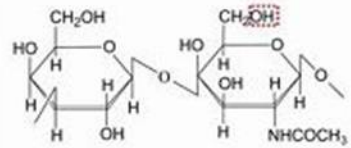
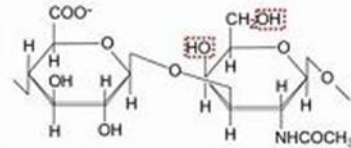
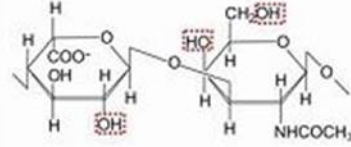
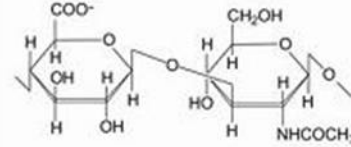
São compostos de sustentação que preenchem o espaço extracelular dos tecidos conjuntivos, sendo capazes de controlar o fluxo de água e de nutrientes. *In vitro*, os proteoglicanos têm uma afinidade para diversos ligantes, incluindo fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, compostos da matriz, enzimas e inibidores enzimáticos. No cerebelo, os GAGs apresentam uma expressão espaço-temporal altamente controlada durante o desenvolvimento do sistema nervoso e durante a sua maturação (Margolis and Margolis, 1994). Os GAGs controlam a organização estrutural da matriz extracelular, modulam as atividades dos fatores de crescimento, de FGF, de TGF- $\beta$ , do cofactor II da heparina, e os processos de mobilidade e de adesão celular, como a migração celular, o crescimento axonal, a proliferação, morfogênese e a apoptose (Sasisekharan and Venkataraman, 2000; Turnbull *et al.*, 2001). Desempenham, igualmente, um papel favorecendo ou inibindo o crescimento dos neuritos (Bovolenta and Feraud-Espinosa, 2000). No SNC adulto, a expressão dos proteoglicanos é alterada em contextos de injúria ou doença (Rudge and Silver, 1990; McKeon *et al.*, 1991; Kolset and Salmivirta, 1999).

As unidades dissacarídicas dos GAGs são degradadas, por um grande número de enzimas lisossomais, em monossacarídeos e em sulfatos inorgânicos. As figuras 6 e 7 ilustram as vias de degradação do HS e DS, respectivamente, e os défices enzimáticos associados a cada tipo de MPS em que se observa depósito destes dois GAGs (Neufeld and Muenzer, 2001).

Os GAGs são produtos de degradação da segmentação proteolítica dos proteoglicanos. Num contexto fisiológico normal, o perfil de GAGs excretados na urina varia pouco com a idade e com o sexo. Nas MPS, os motivos de sulfatação e a natureza dos resíduos terminais das cadeias dos GAGs são característicos de cada tipo de MPS, como mostrado em um estudo de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) sobre GAG urinários de pacientes afetados por MPS I, II, IIIA e VI (Hochuli *et al.*, 2003). Por exemplo, os pacientes com MPS IIIA, que apresentam anomalias essencialmente do SNC, excretam HS muito sulfatados enquanto que os pacientes com MPS I excretam HS pouco sulfatados. Esta técnica de análise de GAGs por RMN poderia permitir um acompanhamento

dos pacientes quando das terapias de reposição enzimática ou transplante de medula óssea.

**Quadro 1:** Estrutura das diferentes cadeias de glicosaminoglicanos (GAG)

GAG	Ácido hexurônico ou idurônico	Osamina	Composição dissacarídica	
<b>Heparan sulfato/ Heparina</b>	Ácido D-glucurônico (GlcA)	-	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>GlcA <math>\beta(1\rightarrow4)</math> GlcNAc <math>\alpha(1\rightarrow4)</math></p>
	Ácido L-idurônico (IdoA)	-	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>IdoA <math>\alpha(1\rightarrow4)</math> GlcNAc <math>\alpha(1\rightarrow4)</math></p>
<b>Keratan sulfato</b>	-	Galactose (Gal)	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>Gal <math>\beta(1\rightarrow4)</math> GlcNAc <math>\beta(1\rightarrow3)</math></p>
<b>Condroitin sulfato</b>	Ácido D-glucurônico (GlcA)	-	D-galactosamina (GalNAc)	 <p>GlcA <math>\beta(1\rightarrow3)</math> GalNAc <math>\beta(1\rightarrow4)</math> (1<math>\rightarrow</math>6)</p>
<b>Dermatan sulfato</b>	Ácido D-glucurônico (GlcA) Ácido L-idurônico (IdoA)	-	D-galactosamina (GalNAc)	 <p>IdoA <math>\beta(1\rightarrow3)</math> GalNAc <math>\beta(1\rightarrow4)</math></p>
<b>Ácido hialurônico</b>	Ácido D-glucurônico (GlcA)	-	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>GlcA <math>\beta(1\rightarrow3)</math> GlcNAc <math>\beta(1\rightarrow4)</math></p>

\*Os diferentes sítios de sulfatação de cada GAG são indicados por pontilhados vermelhos; os sítios sem sulfatação são indicados em preto.

## 2.1 HEPARAN SULFATOS

### 2.1.1 ESTRUTURA DOS HEPARAN SULFATOS

As cadeias de HS são normalmente ligadas à proteína por um resíduo serina, para formar os HS-proteoglicanos (HSPG), que estão localizados na superfície celular e em nível da matriz extracelular. O HS é constituído de resíduos de ácido glucurônico e de ácido  $\alpha$ -L-idurônico, alguns sulfatados, em alternância com resíduos glucosaminas  $\alpha$ -ligados (quadro 1). Estes são sulfatados ou acetilados sobre o grupo amino, podendo ser sulfatados na hidroxila da posição -6. Uma parte dos heparan sulfato-proteoglicanos (HSPG) recém sintetizados é integrada à membrana plasmática, endocitada e catabolisada, com meia-vida de quatro a seis horas em certos tipos celulares (Hopwood and Morris, 1990; Neufeld and Muenzer, 2001).

### 2.1.2 CATABOLISMO DOS HEPARAN SULFATOS

O HSPG sofre primeiramente proteólise nos endosomas precoces, originando cadeias simples de HS, de cerca de 30 kDa, que são degradadas, em seguida, por enzimas específicas, no lisossoma. Esta degradação ocorre através de uma cascata de reações que se devem à ação de três glicosidases, cinco sulfatases e uma acetiltransferase, como mostrado na figura 5 (Hopwood and Morris, 1990; Neufeld and Muenzer, 2001). Estas enzimas lisossomais não são específicas dos substratos, mas do tipo de ligação. É por isso que catalisam igualmente a degradação de outros proteoglicanos, como o DS, o KS e o CS.

#### As Glicosidases

Os resíduos terminais de ácido glucurônico e do ácido L-idurônico do HS são hidrolisados pela  $\beta$ -glucuronidase e pela  $\alpha$ -L-iduronidase, respectivamente (etapas 8 e 2 da figura 6). Estas enzimas estão igualmente envolvidas na degradação dos DS. Assim, os indivíduos que têm uma deficiência em  $\alpha$ -L-iduronidase (doenças Hurler, Hurler-Scheie e Scheie [MPS I]) e os que têm uma deficiência em  $\beta$ -glucuronidase (doença de Sly [MPS VII]) têm a degradação dos HS e dos DS bloqueada. A  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidase, enzima deficitária nos MPS IIIB (doença de Sanfilippo de tipo B), suprime os resíduos N-acetilglucosamina dos HS (etapa 6 da figura 6).

### As sulfatases

A iduronato sulfatase é necessária para a desulfatação dos resíduos de ácido idurônico 2-sulfato na cascata de degradação dos HS (etapa 1 da figura 5). Os indivíduos com deficiência desta enzima (doença de Hunter [MPS II]) têm, igualmente, a via de degradação dos HS e DS bloqueada. A glucuronato 2-sulfatase hidrolisa o ácido glucurônico sulfatado do HS (etapa 7 da figura 5). Nenhuma deficiência nesta enzima foi constatada ou demonstrada até agora. A sulfamidase, igualmente chamada heparan N-sulfatase, ausente na doença de Sanfilippo de tipo A (MPS IIIA), é uma enzima específica dos grupamentos sulfatos, ligados aos grupamentos amina da glucosamina (etapa 4 da figura 5). A glucosamina-6-sulfatase (etapa 3 da figura 6) cliva o sulfato do carbono 6 da N-acetil ou N-Sulfato glucosamina e é a enzima deficiente na doença de Sanfilippo de tipo D (MPS IIID).

### A acetiltransferase

A acetil-CoA,  $\alpha$ -glucosamina N-acetiltransferase, deficiente na doença de Sanfilippo de tipo C (MPS IIIC), catalisa a acetilação dos grupamentos amina da glucosamina para permitir a ação subsequente da  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidase (etapa 5 da figura 5). Por último, as endoglicosidases participam igualmente no catabolismo do HS, clivando o polímero em pequenos fragmentos que podem ser excretados na urina.

A atividade de duas enzimas foi demonstrada, a da endo-N-acetilglucosaminidase, e a endoglucuronidase (ou endoheparanase). Esta degradação rápida permite obter oligossacarídeos de 5 kDa, que são assim eliminados na urina.

#### 2.1.3 O PAPEL DOS HEPARAN SULFATOS

Os HS são ubíquos nos tecidos de mamíferos e se localizam ao nível da superfície celular e da matriz extracelular. A distribuição tecidual é determinada pela natureza do core proteico. Os HSPG da superfície celular pertencem essencialmente às famílias de sindecanos e de glipicanos. O perlecano é um HSPG secretado, presente de maneira abundante em nível das membranas basais.

Os HSPG desempenham um papel essencial nas interações célula-célula e proteína-célula. Além disso, os HS têm um amplo espectro de atividades

biológicas e de funções, como adesão celular, regulação da proliferação celular, coagulação sanguínea, endocitose de lipoproteínas ou de outras proteínas a partir da superfície celular, angiogênese, invasão viral, metástases tumorais e regulação de certos fatores de crescimento (Salmivirta *et al.*, 1996; Rabenstein, 2002). Os HS desempenham papel igualmente importante na ação de citocinas, na modulação da atividade biológica do interferon  $\gamma$ , ligando-se à citocina, e na regulação da catálise enzimática (Salmivirta *et al.*, 1996). Estudos em drosófilas mostraram que os HSPG são cruciais na sinalização dos fatores de crescimento. Com efeito, a ruptura da síntese dos HS provoca um bloqueio das vias de sinalização de *Wingless*, de *Hedgehog*, de *Decapentoplegic* e do *FGF* (Bornemann *et al.*, 2004). Os HS protegem igualmente as proteínas da degradação, controlam o transporte proteico através das membranas basais, intervêm na internalização de certas proteínas e na regulação do desenvolvimento do tecido neural. Atuando como receptores e co-receptores na membrana celular, as cadeias de HSPG participam nos mecanismos de infecção viral, como é o caso dos vírus herpes, o vírus da Dengue, o vírus da imunodeficiência humana de tipo 1 (HIV-1) (Rabenstein, 2002) e dos vírus adeno-associados (AAV) (Summerford and Samulski, 1998). Estas diferentes atividades dependem geralmente das interações entre as proteínas e os HS, geralmente sobre grupamentos sulfatados (Salmivirta *et al.*, 1996).

Os HSPG localizados na superfície celular estão em equilíbrio dinâmico com uma estrutura que pode alterar em função dos sinais extracelulares, como, por exemplo, os fatores de crescimento (Turnbull *et al.*, 2001).

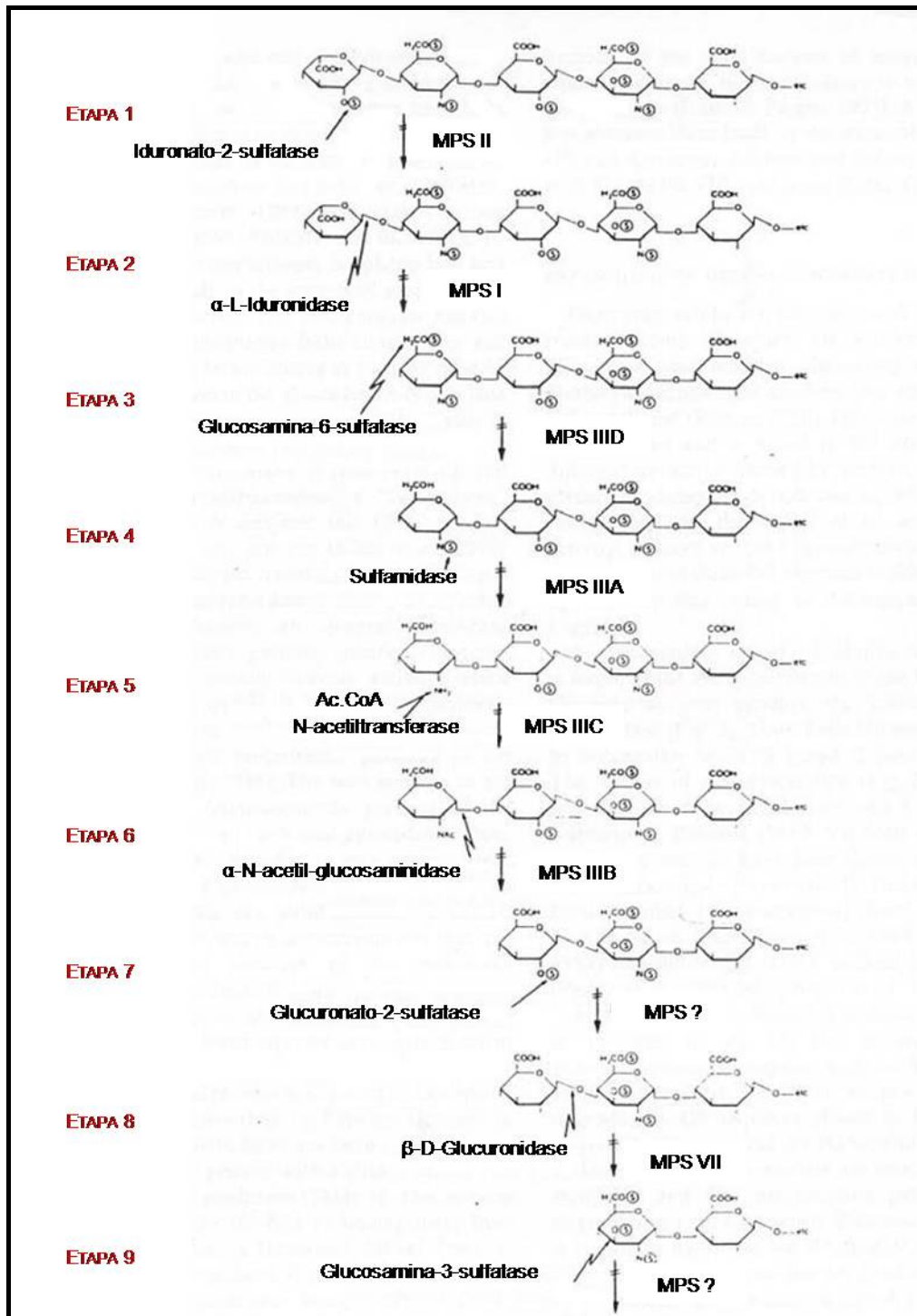
No sistema nervoso, a maior parte dos resíduos glucosamina dos HS é N-sulfatada. Duas famílias principais de HSPG integram a membrana, os sindecanos (pequenas proteínas transmembranares de 33 kDa com 3 à 4 sítios de glicosilação), e os glipicanos (proteínas ancoradas à membrana celular por uma cauda glicosilfosfatidilinositol (GPI), de 60 a 65 kDa, que contém 2 a 3 sítios de glicosilação), ou ainda proteínas da matriz extracelular, como os perlecanos (Bandtlow and Zimmermann, 2000). Os sindecanos ligam o FGF-2 e o seu receptor, e os glipicanos fixam o complexo antitrombina III-trombina (Stringer and Gallagher, 1997).

Supõe-se que estejam envolvidos nas interações célula-ambiente, por ancoragem de um número variável de HS que fixa moléculas, como fatores de crescimento, ligantes da matriz e moléculas da superfície celular. De fato, os HS são conhecidos como receptores de fraca afinidade para os membros da família do FGF, como o FGF-1 e o FGF-2 (Rapraeger *et al.*, 1991; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Yayon *et al.*, 1991; Nurcombe *et al.*, 1993). São necessários para a formação do complexo estável, trimolecular, de sinalização entre o FGF (Rapraeger *et al.*, 1991; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991) e o seu receptor, o FGFR (Yayon *et al.*, 1991) e podem, assim, controlar especificamente a atividade do FGF. A atividade biológica do FGF-2 depende da sua capacidade de se ligar aos HS da superfície celular ou da matriz extracelular (Schlessinger *et al.*, 1995). Estes podem estabilizar o FGF-2, protegendo-o da proteólise e da desnaturação térmica (Saksela and Rifkin, 1990). O FGF-2 controla a proliferação ou a reatividade dos astrócitos, quando de um dano do SNC. Esta ação é modulada pelos HS, os quais agem diretamente sobre o FGF-2 ou sobre o seu receptor (Gomez-Pinilla *et al.*, 1997). Os HSPG, juntamente com as integrinas  $\alpha\beta 5$  e o receptor 1 ao FGF, intervêm na fixação e na internalização dos vírus AAV-2 na célula (Summerford and Samulski, 1998; Bartlett *et al.*, 1999; Qing *et al.*, 1999; Summerford *et al.*, 1999).

Aspectos estruturais específicos, que incluem sulfatação dos HS, em especial os 6-O-sulfatos, são essenciais para a interação do HSPG com o FGF-2, graças aos receptores FGFR-1 (Pye *et al.*, 1998) e do PDGF com o seu receptor (Rolny *et al.*, 2002). Estes motivos estruturais sulfatados são essencialmente responsáveis por numerosas fixações proteicas e pelas propriedades regulatórias dos HS (Turnbull *et al.*, 2001). Com efeito, existem sequências específicas nos domínios N-acetilados, e nas unidades dissacarídicas N-acetiladas e N-sulfatadas das cadeias de HS, que são designadas para interações seletivas com certas proteínas. As interações do HS com os FGF implicam de maneira preferencial os domínios N-sulfatados do polisacárido (Turnbull *et al.*, 2001). No entanto, embora diversos domínios sejam caracterizados, pouco se sabe em relação à regulação da sua formação *in vivo*. A análise química e enzimática dos HS excretados na urina de pacientes com a doença de Hunter e de Sanfilippo revela que as extremidades não reduzidas dos HS são diferentes de acordo com a deficiência enzimática (Toma *et al.*, 1996). Na



urina de pacientes MPS IIIA e MPS IIIB, níveis importantes de glucosamina N-sulfato e de N-acetilglucosamina, respectivamente, são observados sobre as extremidades dos HS, enquanto sobre os HS que provêm de pacientes MPS II, a extremidade não reduzida é o ácido urônico sulfatado. Na doença de Sanfilippo de tipo C, os HS são portadores de glucosamina com um grupo amina não substituído (Bernfield *et al.*, 1999).



**Figura 5: Catabolismo dos heparan sulfatos no lisossoma e os tipos de mucopolissacaridose associados (adaptado de Hopwood and Morris, 1990).**

A degradação dos heparan-sulfatos ocorre pela ação sequencial de 9 enzimas lisossomais específicas, incluindo 3 glicosidases, 5 sulfatases e uma acetil-transferase. Dentre as doenças de depósito lisossomal, apenas as mucopolissacaridoses são observadas, quando de distúrbios nesta cascata de degradação.

## 2.2 DERMATAN SULFATOS

### 2.2.1 ESTRUTURA DOS DERMATAN SULFATOS

O dermatan sulfato (DS) é constituído de resíduos de ácido L-idurônico, alguns dos quais são sulfatados em C-2, e, mais raramente, de resíduos de ácido glucurônico, alternados com resíduos N-acetilgalactosamina  $\beta$ -ligados, que são sulfatados em C-4 ou C-6 (quadro 1). A proteólise do DS-proteoglicanos (DSPG) produz cadeias simples de DS, que são hidrolisadas em oligossacarídeos, pela ação da endoglicosidase. A degradação lisossomal final dos DS se dá sob a ação sequencial de três glicosidasas e duas sulfatases, como mostrado sobre a figura 6 (Hopwood and Morris, 1990; Neufeld and Muenzer, 2001).

### 2.2.2 CATABOLISMO DOS DERMATAN SULFATOS

#### As glicosidasas

As três glicosidasas responsáveis pela degradação do DS são a  $\alpha$ -L-iduronidase, a  $\beta$ -glucuronidase e as hexosaminidasas A ou B. A  $\alpha$ -L-iduronidase hidrolisa os resíduos ácido  $\alpha$ -L-idurônicos terminais dos DS (etapa 2 da figura 6) e dos HS, como mostrado previamente (etapa 2 da figura 5). Tal enzima é deficiente na doença de Hurler (MPS I). A  $\beta$ -glucuronidase, deficitária na doença de Sly (MPS VII), cliva os resíduos de ácido glucurônico dos DS (etapa 5 da figura 6), dos HS (etapa 8 da figura 5) e dos CS. Por último, as hexosaminidasas A ou B intervêm na hidrólise dos resíduos N-acetilgalactosamina (etapa 4 da figura 6) (via alternativa). A deficiência destas duas enzimas não provoca uma MPS, mas uma gangliosidose, GM2, conhecida sob o nome de doença de Sandhoff. Nos fibroblastos que provêm de pacientes afetados por esta doença, o acúmulo dos DS é moderadamente elevado. Isto se deve, provavelmente, à degradação dos DS pela isoenzima S da  $\beta$ -hexosaminidase, presente em baixa quantidade nestes pacientes.

#### As sulfatases

A iduronate sulfatase, deficitária na doença de Hunter (MPS II), cliva o sulfato na posição 2 do ácido  $\alpha$ -L-idurônico presente no DS (etapa 1 da figura 6) e também no HS (etapa 1 da figura 5).

A arilsulfatase B, igualmente chamada de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase, provoca a desulfatação na posição 4 dos resíduos N-acetilgalactosamina (etapa 3 da figura 6). A sua deficiência provoca a doença de Maroteaux-Lamy (MPS VI).

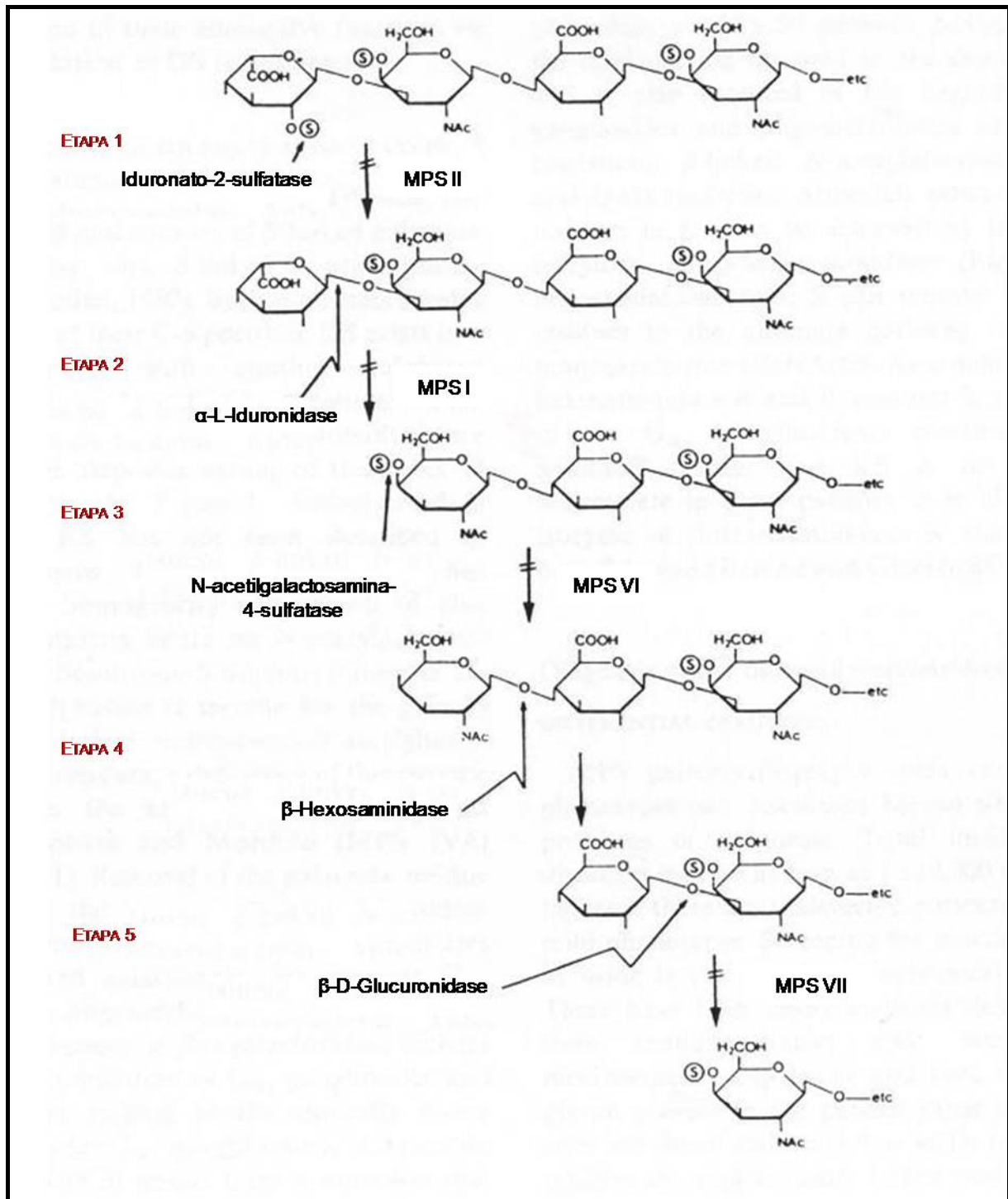
### 2.2.3 O PAPEL DOS DERMATAN SULFATOS

Os dermatan sulfatos (DS) são expressos essencialmente em nível da pele, da cartilagem e do olho (Trowbridge and Gallo, 2002). No SNC adulto, estão presentes em fraca quantidade (Margolis and Margolis, 1994).

Como os HS, servem de moduladores-chave nas respostas biológicas, desempenhando papel de estabilizadores; cofatores e/ou co-receptores dos fatores de crescimento, de citocinas e de quimioquinas; reguladores de atividade enzimática; moléculas de sinalização em resposta a danos celulares, como uma ferida, uma infecção ou um tumor; e, por último, de alvos para as bactérias, vírus e parasitas que os utilizam para unirem-se à célula e invadi-la, a fim de desorganizar o seu sistema imune (Rostand and Esko, 1997; Schmidtchen *et al.*, 2001; Trowbridge and Gallo, 2002).

O comprimento variável das cadeias de DS, a sua composição dissacarídica e sua sulfatação determinam a afinidade e as interações funcionais com as diferentes proteínas. Os DS fixam diversas moléculas, como moléculas da matriz extracelular, fatores de crescimento, inibidores de proteases, citocinas e quimioquinas (Trowbridge and Gallo, 2002). Os DS atuam na cascata da coagulação fixando-se sobre o cofactor II heparina, um homólogo serpina da trombina III, inibindo o efeito coagulante da trombina (Liaw *et al.*, 2001). Também influenciam na coagulação ativando os efeitos da proteína C activada (Petaja *et al.*, 1997).

Só o FGF-2 pode ligar-se e ser ativado pelo DS. Esta interação entre o DS e o FGF-2 foi estudada apenas no que diz respeito à proliferação celular (Penc *et al.*, 1998).



**Figura 6: Catabolismo dos dermatan sulfatos no lisossoma e os tipos de mucopolissacaridoses associados (adaptado de Hopwood and Morris, 1990).** A degradação dos dermatan-sulfatos ocorre pela ação sequencial de 6 enzimas lisossomais específicas, incluindo 3 glicosidases e 3 sulfatases. Dentre as doenças de depósito lisossomal, apenas as mucopolissacaridoses são observadas, quando de distúrbios nesta cascata de degradação.

## PARTE II - DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS

As doenças metabólicas hereditárias (DMH) constituem um grupo de doenças cuja etiologia é um erro inato do metabolismo (EIM). Este termo foi usado pela primeira vez por Archibald Garrod, em 1908, quando sugeriu que determinadas situações clínicas, como a alcaptonúria, o albinismo, a cistinúria e a pentosúria, seriam conseqüência de defeitos em vias metabólicas. Com isso, deu origem ao conceito, bastante revolucionário para época, de individualidade bioquímica (Hopwoods and Brooks, 1997).

Atualmente os EIM, ou DMH, são caracterizados como uma alteração genética que leva à falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas, envolvidas no anabolismo ou no catabolismo de uma determinada substância, ou a defeitos no transporte de proteínas. Até o momento são conhecidos mais de 400 DMH e uma mesma doença ainda pode apresentar expressividade variável, dependendo do tipo de mutação (Alberts *et al.*, 1994; Hopwoods and Brooks, 1997).

A falta de atividade de uma enzima em determinada via metabólica pode ter como conseqüências o acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade; a deficiência de produtos intermediários críticos; a deficiência de produtos finais específicos; ou o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias (Alberts *et al.*, 1994).

A maioria dos EIM apresenta padrão de herança autossômica recessiva, mas ainda há as que são de herança ligada ao X e as de herança mitocondrial. A incidência cumulativa de EIM é de 1:5.000 recém-nascidos vivos, embora sejam consideradas raras individualmente, com incidência variável. No Brasil os registros de incidência são para algumas patologias isoladas (Alberts *et al.*, 1994; Hopwoods and Brooks, 1997).

O diagnóstico definitivo de um EIM é feito pela determinação da atividade enzimática ou identificação do defeito molecular. No entanto, esse tipo de exame só pode ser indicado, a partir de fortes suspeitas clínicas, que constituem o fator crucial para o diagnóstico correto, através da coleta de dados da história clínica e familiar e exames de triagem urinária e sangüínea (Wraith, 1995).

Segundo Saudubray and Charpentier (1995), os EIM podem ser classificados em três grandes grupos de acordo com seu fenótipo clínico.

## GRUPO 1 – DEFEITOS DE SÍNTESE OU CATABOLISMO DE MOLÉCULAS COMPLEXAS

Doenças cujos sinais e sintomas são permanentes e progressivos, tais como as Doenças Lisossomais de Depósito e as Doenças Peroxissomiais.

## GRUPO 2 – DEFEITO NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

Este grupo é constituído por doenças que se caracterizam por intoxicação aguda e recorrente ou crônica e progressiva, tais como aminoacidopatias, os defeitos dos ácidos orgânicos e do ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares.

## GRUPO 3 – DEFEITO NA PRODUÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ENERGIA

Doenças resultantes da deficiência na produção ou utilização de energia devido a erros inatos do metabolismo intermediário no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Este grupo inclui as doenças de depósito de glicogênio, defeitos na gliconeogênese, hiperlactemias congênitas, defeitos na oxidação dos ácidos graxos e doenças mitocondriais da cadeia respiratória.

### **1. DOENÇAS LISOSSOMAIS DE DEPÓSITO**

Foi em 1965 que Hers definiu o conceito de doenças de depósito lisossomal, ao explicar a relação entre a  $\alpha$ -glucosidase e a doença de Pompe (Hers, 1965). Ele sugeriu que na ausência desta enzima, o glicogênio não digerido acumulava-se nos lisossomas, provocando a sua distensão e danos irreversíveis em nível celular.

As doenças de depósito lisossomal são EIMs caracterizados por mutações em genes que codificam hidrolases ácidas. A perda ou redução da atividade enzimática leva à disfunção celular devido ao acúmulo de substratos não degradados no lisossoma. A maioria destas doenças acarreta lesões de depósito global no sistema nervoso central, resultando em neurodegeneração progressiva e retardo mental (Passini *et al.*, 2003).

Atualmente, a causa principal das diferentes doenças de depósito lisossomal é conhecida. Na maioria dos casos, trata-se de uma deficiência em uma enzima lisossomal. Às vezes, é um cofator do tipo « *liftase* » (ativador de gangliosídeo GM2 ou prosaposina), necessário à ativação de determinadas hidrolases lisossomais, que é defeituoso (Furst and Sandhoff, 1992). Este é algumas vezes o

caso na doença de Tay-Sachs, de Gaucher tipo 3, na leucodistrofia metacromática e na deficiência da prosaposina.

Outras situações particulares podem ser observadas, nas quais mais de uma enzima lisossomal é deficiente ou deficitária. Estas doenças são classificadas como de déficit enzimático múltiplo. É o caso da mucopolidose tipo II, na qual o gene que codifica a fosfotransferase, necessária à síntese do sinal de endereçamento, está mutado. Tal mutação impede o endereçamento das hidrolases aos lisossomas pela via do receptor manose-6-fosfato. Neste grupo de doenças, a mucosulfatidose é caracterizada por uma deficiência na *formyl glycine forming enzyme* (FGE) do retículo endoplasmático, levando ao acúmulo de GAGs sulfatados e glicolípídeos sulfatados no cérebro e nos órgãos viscerais. Na galactosialidose, ocorre uma dupla deficiência de atividade enzimática, da sialidase ( $\alpha$ -D-N-acetil-neuraminidase) e da  $\beta$ -galactosidase. Esta deficiência é secundária, já que está relacionada à proteólise excessiva destas enzimas. A causa é um defeito em uma proteína estabilizadora do complexo composto por estas duas enzimas, que neste caso, fica desestabilizado (D'Azzo *et al.*, 1982).

Enfim, outra causa deste grupo de doenças diz respeito à deficiência ou disfunção de um dos transportadores localizados na membrana lisossomal. Estes transportadores são indispensáveis para a saída dos produtos de degradação presentes na luz do lisossoma para o citoplasma. A deficiência de uma dessas proteínas provoca o acúmulo lisossomal de moléculas intermediárias, de baixo peso molecular, tal como o ácido siálico, na doença de Salla; a cistina, na cistionose; e a vitamina B12, nas doenças de defeito no transporte da vitamina B12 (Pisoni and Thoene, 1991).

Atualmente, as doenças de depósito lisossomal são classificadas segundo a natureza bioquímica do material de depósito acumulado (Glew *et al.*, 1985). Por exemplo, dez deficiências diferentes podem afetar a via de degradação dos mucopolissacarídeos (mucopolissacaridoses), cinco são conhecidos para a via de degradação de glicoproteínas (glicoproteinoses), uma para o acúmulo intra-lisossomal de glicogênio (glicogenoses), e oito deficiências afetam o catabolismo dos esfingolípídeos (lipidoses). Uma classificação com base no defeito molecular pode igualmente ser feita: deficiência em uma única hidrolase lisossomal, deficiência em múltiplas enzimas lisossomais, deficiência de outra proteína



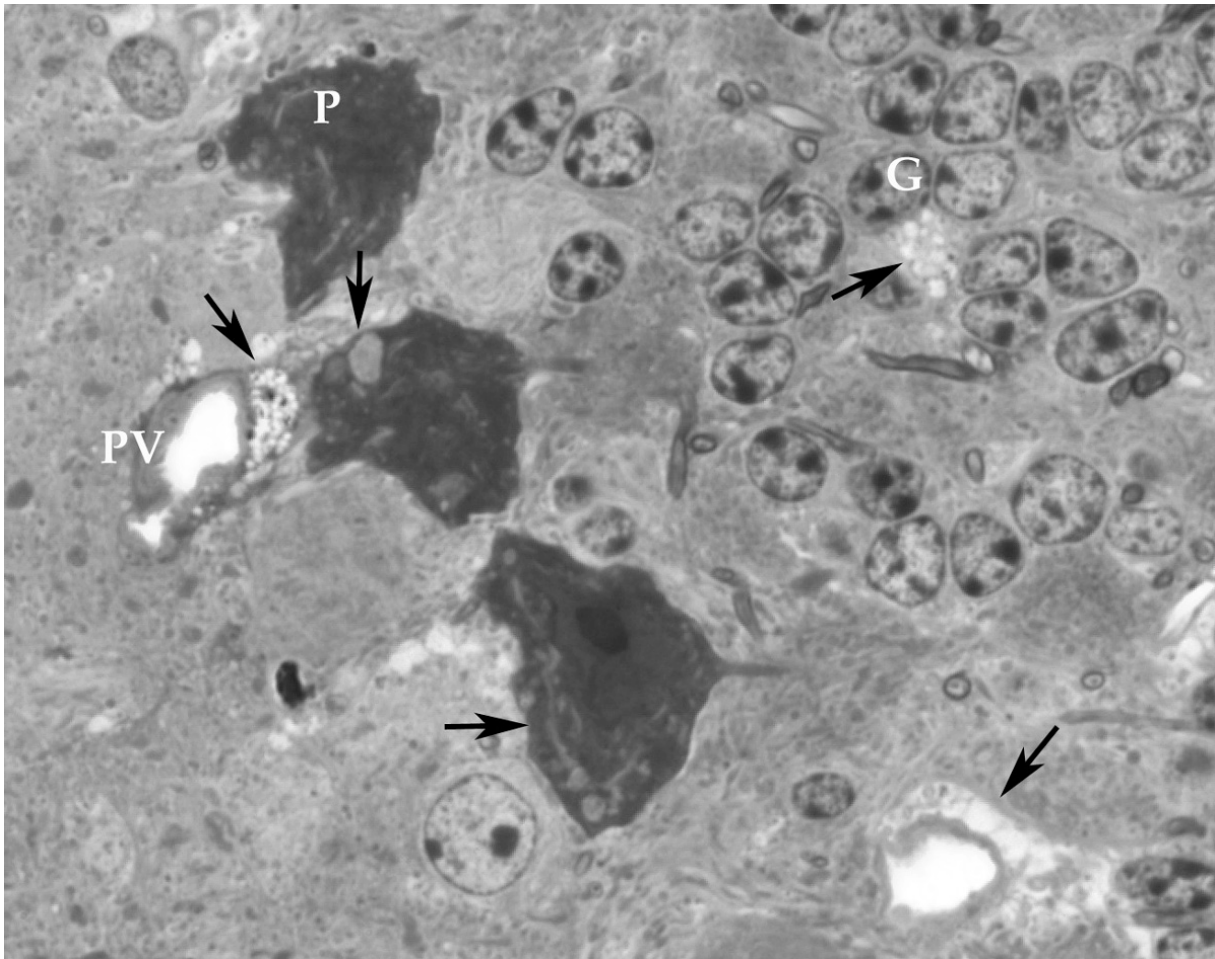
lisossomal ou não-lisossomal, deficiência ou disfunção de transportadores da membrana lisossomal ou deficiência em uma proteína necessária para o tráfego intervesicular ou endolisossomal (Saudubray and Charpentier, 1995).

#### 1.1 GÉNÉTICA, SINAIS CLÍNICOS E VARIABILIDADE FENOTÍPICA

As doenças de depósito lisossomal representam um grupo de mais de 50 doenças hereditárias monogênicas distintas. A maior parte destas doenças é herdada de forma autossômica recessiva, com exceção da doença de Fabry, de Danon e da mucopolissacaridose de tipo II (chamado igualmente doença de Hunter), que mostram uma herança recessiva ligada ao cromossoma X. Elas se caracterizam pelo acúmulo de macromoléculas não degradadas, ou parcialmente degradadas, nos lisossomas (glicolipídeos, glicoproteínas, GAGs, etc.), que desencadeia uma cascata de anomalias metabólicas, que, por sua vez, refletem-se no funcionamento da célula. Tal acúmulo resulta em um aumento da dimensão e do número de lisossomas de 1% a 50% do volume celular total em todos os tecidos do organismo (Gieselmann, 1995) (figura 7). A maior parte das enzimas lisossomais é de exohidrolases que degradam sucessivamente os resíduos terminais. A deficiência de uma só enzima provoca o bloqueio de uma via inteira, implicada no catabolismo, dado que o defeito de eliminação de um resíduo terminal produz um substrato inacessível para a hidrólise por outras enzimas lisossomais.

Entre estes grupos, quase todas as doenças mostram uma variabilidade clínica, em especial no que diz respeito à idade do aparecimento da doença e à progressão dos sintomas. Três formas diferentes são podem ser distintas em função da idade de início e da progressão dos sintomas: infantil (severo), juvenil (intermediário) e adulto (moderado). As doenças de depósito lisossomal afetam geralmente crianças e têm um impacto devastador no âmbito familiar. Os indivíduos atingidos podem apresentar um amplo espectro de sintomas clínicos, e a disfunção do sistema nervoso central (SNC), manifestando-se desde problemas de comportamento a atraso mental severo, é própria de um grande número de doenças deste grupo. Muitas apresentam anomalias esqueléticas, organomegalia, opacidades da córnea e características dismórficas (Neufeld and Muenzer, 2001). Nos casos mais severos, a criança necessita de um acompanhamento médico constante e, geralmente, morre antes da adolescência.

A maior parte dos genes que codificam para as enzimas lisossomais já foi identificada e para muitas delas há modelos animais disponíveis. O número e o tipo de mutação, descobertos nas diferentes doenças de depósito lisossomal aumentam regularmente. Contudo, as correlações genótipo-fenótipo são freqüentemente difíceis de estabelecer. Entretanto, além destas distinções clássicas, a expressão clínica varia de um paciente a outro de acordo com a gravidade da lesão molecular e com o *background* genético. Mesmo na completa ausência de uma enzima os sintomas clínicos são heterogêneos. A explicação da variabilidade clínica devido à deficiência de uma mesma enzima ainda não é bem conhecida. No entanto, a maioria dos fenótipos graves é observada quando nenhuma enzima funcional é produzida, enquanto que as mutações que não abolem completamente a função enzimática são responsáveis por variações menos graves. A variabilidade fenotípica poderia explicar-se pelo contexto genético do paciente e por fatores ambientais e epigenéticos (Beck, 2001; Maire, 2001).



**Figura 7: Exemplo de depósito lisossomal no cérebro de camundongo MPS I** (foto da *Unité de Rétrovirus et Transfert Génétique*, Instituto Pasteur – dados não publicados) .

*P: células de Purkinje; PV: perivasculares; G: células gliais. As flechas mostram a presença de depósito lisossomal. Escala: 25µm.*

## 1.2. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico pré-natal destas doenças só pode ser feito em caso de antecedente familiar. Neste contexto, o diagnóstico pré-natal está disponível. Em outros casos, o diagnóstico de uma criança afetada faz-se vários meses após o nascimento, após reconhecimento dos primeiros sintomas eventualmente comuns às várias doenças lisossomais. O diagnóstico pode ser sugerido por exames radiológicos adequados e, em certos pacientes, a prova da sobrecarga lisossomal pode ser observada sobre esfregaço sangüíneo ou sobre uma punção medular. Geralmente o diagnóstico final só é possível através da investigação sistemática das doenças lisossomais (Young, 1992).

Assim, atualmente, exceto em casos de antecedente familiar da doença, a investigação pré-sintomática sistemática em todos os recém-nascidos ainda não está disponível, ainda que seja ampla e seriamente discutida. O diagnóstico pré-natal é feito alguns dias após o nascimento, a partir de uma gota de sangue recolhida sobre um papel mata-borrão. É o caso da fenilcetonúria e da mucoviscidose (teste de Guthrie). Estas análises justificam-se porque são simples (dosagem no sangue), pouco dispendiosas e referem-se a doenças relativamente freqüentes, mas, sobretudo, porque existem tratamentos específicos para algumas delas (Young, 1992).

As doenças de depósito são freqüentemente devastadoras para os pacientes e suas famílias. Representam um problema de saúde importante, com um custo considerável para a sociedade devido à necessidade de hospitalização, de intervenções cirúrgicas e de tomadas de medidas paramédicas que visam melhorar a qualidade e a esperança de vida dos pacientes (Meikle *et al.*, 1999).

Recentemente, métodos de diagnóstico precoce foram desenvolvidos para detectar as DLDs ao nascimento (Meikle *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000; Wenger *et al.*, 2002). Estes testes pilotos feitos a partir de algumas gotas de sangue ou partir de plasma efetuam-se em duas etapas, uma dosagem da atividade de certas proteínas estruturais da membrana lisossomal (LAMP-1, LAMP-2) ou da saposina C. Em seguida, analisa-se o material de sobrecarga por espectrometria de massa em tandem, com o objetivo primeiramente de ser mais precisos e, por conseguinte, de fazer menos busca nas famílias.

A possibilidade de um diagnóstico sistemático destas doenças ao nascimento permitiria obter valores exatos relativos à sua prevalência e avaliar o custo do manejo dos pacientes, o que favoreceria a instauração de determinadas intervenções terapêuticas. Contudo, as limitações atuais referem-se aos falsos-negativos (apenas 80% das doenças de sobrecarga lisossomal são detectadas), e aos falso-positivos demasiadamente elevados (1%). Infelizmente, o pouco de tratamento disponível atualmente limita os esforços feitos neste sentido.

### 1.3 PREVALÊNCIA

Consideradas individualmente, as doenças de depósito lisossomal são raras (exceto em certos grupos étnicos: prevalência elevada da doença de Gaucher tipo

1 [1 :855 nascimentos] e da doença de Tay-Sachs [1 :3900 nascimentos] em judeus ashkenases.), mas em conjunto, passam a ter um impacto significativo em nível populacional (Meikle *et al.*, 1999; Poorthuis *et al.*, 1999). Até o momento, poucos artigos abordam a prevalência destas doenças, devido à necessidade de longos períodos de observação para coletar um número suficiente de casos. Ao que parece, a doença de Gaucher tipo 1 é a mais comum, seguida pelo grupo das mucopolissacaridoses (MPS).

A expectativa de vida de um paciente afetado depende da doença em questão, da sua gravidade e do tratamento disponível. Nas MPS, ela pode variar de formas letais (MPS VII) a formas que sequer influenciam na expectativa de vida. Mas, de uma maneira geral, na maioria das doenças de depósito lisossomal há uma correlação entre a idade ao diagnóstico, a gravidade e a expectativa de vida.

## **2. DOENÇAS LISOSSOMAIS DE DEPÓSITO E NEURODEGENERAÇÃO**

Devido à complexidade do cérebro e sua vital importância, a correção de suas manifestações patológicas é tão desejada quanto difícil. Até o momento, não há um método universalmente eficaz para tratar diretamente o cérebro, e este fato tem criado uma grande barreira para o tratamento eficaz de muitas doenças. A administração periférica de enzima recombinante, de células geneticamente corrigidas ou de vetores recombinantes em camundongos adultos não é capaz de reverter danos cerebrais já estabelecidos, em parte devido à permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica (Stein *et al.*, 2001). Existe uma variedade de estratégias, incluindo a abertura da barreira hemato-encefálica através de várias abordagens físicas e biológicas, o uso de carreadores capazes de cruzar a barreira, e o uso de técnicas de injeção direta, incluindo administração intraparenquimal, intraventricular e intratecal. Os métodos intraparenquimais têm sido estudados tanto em humanos como em animais (Sampson *et al.*, 2003) e a administração intraparenquimal direta de vírus recombinantes ou células tem mostrado resultados positivos na melhora de patologias do SNC (Brooks *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2003). A infusão local (*in situ*) também tem sido utilizada para algumas doenças, como no caso do uso de fator neurotrófico derivado da glia para o tratamento de doença de Parkinson (Gill *et al.*, 2003). Estes métodos trabalham com injeção em um único ponto ou em um número limitado de pontos, requerem a

manipulação de cateteres no tecido cerebral e têm limitações potenciais quanto à distribuição de “medicamentos” que necessitem atingir todo o cérebro.

Mais de 60% das doenças de depósito lisossomal apresentam comprometimento do sistema nervoso central (SNC), que permanece como um grande desafio terapêutico (Meikle *et al.*, 1999). Terapias para algumas doenças de depósito lisossomal se beneficiam das propriedades bioquímicas das enzimas lisossomais. Muitas destas enzimas são secretadas, além de serem direcionadas para o lisossoma. Uma vez secretadas, elas podem ser endocitadas seja pela própria célula que a secretou, seja por células vizinhas, via receptores manose 6-fosfato. Este processo de correção cruzada é benéfico para a reversão do depósito lisossomal; poucas células necessitam ser geneticamente corrigidas, e uma pequena porcentagem (1-3%) de atividade enzimática normal é suficiente para a reversão do depósito lisossomal. No entanto, terapias direcionadas para corrigir as manifestações do SNC relacionadas a essas doenças ainda são desafiadoras (Liu *et al.*, 2005a).

Dentre todas as abordagens de injeção cerebral direta, Belichenko *et al.* (2005) e Liu *et al.* (2005a) mostraram que injeções intraventriculares de enzima recombinante (rhIDUA) (MPS I) e de vírus recombinante (MPS VII), respectivamente, no cérebro de camundongos são eficazes na redução do depósito lisossomal no cérebro e meninges, provavelmente devido ao acesso do líquido céfalo-raquidiano (LCR), presente nos espaços ventricular, subaracnóide e perivascular, ao parênquima cerebral.

Como salientado anteriormente, vários trabalhos indicam que uma pequena porcentagem da enzima normal é suficiente para corrigir o depósito de GAGs em vários tecidos e órgãos, inclusive no cérebro (Daly, 1999; Baxter *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003; Kakkis *et al.*, 2004, Hartung *et al.*, 2004; Belichenko *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005a). Pacientes com a Síndrome de Scheie (a forma menos severa da doença), por exemplo, que praticamente não apresentam manifestações do SNC, podem ter menos que 1% de atividade da enzima normal (Neufeld and Muenzer, 2001). Portanto, mesmo a entrega ou expressão de pequenas quantidades de enzima no cérebro poderia levar a uma correção significativa da doença.

### 3. AS MUCOPOLISSACARIDOSES

Dentre as doenças de depósito lisossômico, as mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo heterogêneo de doenças (tabela 1) caracterizadas pela deficiência de alguma enzima lisossomal envolvida na degradação de glicosaminoglicanos (GAGs) (Fuller *et al.*, 2005).

As MPS são doenças raras isoladamente, mas em conjunto representam uma proporção significativa das doenças metabólicas hereditárias severas, com uma incidência mundial estimada de 1:10.000 a 1:25.000 recém-nascidos vivos. Todas as MPS são doenças autossômicas recessivas, com exceção da MPS II que é ligada ao X (Schwartz *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005a).

Com exceção da doença de Hunter (MPSII), todas as MPS são de transmissão autossômica recessiva. Há dez enzimas lisossomais requeridas para a degradação dos GAG. Os defeitos genéticos conduzem à produção ou não de enzimas lisossomais inativas e a uma sobrecarga de glicosaminoglicanos nos tecidos mesenquimais, vísceras e SNC. Estes mucopolissacarídeos parcialmente ou não degradados são dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), keratan sulfato (KS) e chondroitin sulfato (CS) (quadro 1). Seu acúmulo pode ser único ou combinado, de acordo com a etapa de degradação afetada. Estes GAGs são acumulados nos lisossomas de diversos tecidos e excretados na urina. Este material de sobrecarga é amorfo e pode ser observado por coloração metacromática. Os GAGs atraem água, conduzindo a uma distensão osmótica dos lisossomas, o que provavelmente responde pelo funcionamento celular anormal. Os défices enzimáticos foram identificados para todos os tipos de MPS (tabela 1).

Os sinais clínicos dependem da enzima deficitária e do tipo de GAG acumulado nos órgãos afetados. As desordens são crônicas e progressivas e mostram freqüentemente um largo espectro de gravidade clínico de acordo com o déficit (Neufeld and Muenzer, 2001). As MPS caracterizam-se por morbidade multivisceral, organomegalia, disostose múltipla e anomalias faciais. As funções auditivas, visuais, cardiovasculares bem como a mobilidade articular podem ser afetadas.

Todos os MPS podem apresentar manifestações no SNC, com uma neurodegeneração severa. Os tipos I-S, IV e VI não são associados à atraso mental, mas podem apresentar outros sintomas neurológicos.

Dosagens enzimáticas estão disponíveis, em rotina para o diagnóstico das MPS, e são realizados sobre fibroblastos ou leucócitos, podendo ser igualmente feitos a partir de amniocentese ou trofocentese para o diagnóstico pré-natal. Em contrapartida, a análise de indivíduos heterozigotos continua a ser difícil. Teoricamente, os indivíduos heterozigotos apresentam apenas metade da atividade enzimática normal, mas na verdade, observa-se uma sobreposição nas atividades catalíticas dos indivíduos heterozigotos e dos homozigotos normais.

### 3.1 HISTÓRICO

Hunter, em 1917, descreveu dois irmãos que apresentavam sinais clínicos de MPS ligada ao X (Hunter, 1917). Em 1919, Hurler descreveu dois meninos, não aparentados, apresentando sintomas semelhantes à síndrome epônima. Estas manifestações clínicas eram caracterizadas por anomalias esqueléticas múltiplas, opacidade da córnea, hepatoesplenomegalia e deformidades ósseas em sítios específicos. Este fenótipo deu o nome de gargoilismo devido às características faciais grosseiras que as crianças afetadas pela doença apresentavam. Inicialmente, todas as MPS eram remetidas sob o nome da doença de Hurler. Foi apenas em 1952 que Brante identificou e isolou o material de sobrecarga, os glicosaminoglicanos, nos fígados de pacientes com a doença de Hurler e propôs, por conseguinte, o termo de MPS (Brante, 1952). Neufeld e os seus colaboradores mostraram em 1969 que a incubação de fibroblastos de pacientes afetados pela doença de Hurler com os de pacientes com a doença de Hunter normaliza o seu metabolismo (Brante, 1952; Fratantoni *et al.*, 1968,1969). A co-cultura de fibroblastos que provêm de pacientes diferentes, mas afetados pelo mesmo tipo de MPS não corrige o erro metabólico. Contudo, fibroblastos normais corrigem o metabolismo de todas as mucopolissacaridoses. Esta correção das anomalias sugere que a enzima ausente nos fibroblastos que provêm de pacientes afetados seja secretada pelas células normais e captada pelos fibroblastos deficitários onde pode, em seguida, efetuar a sua função catalítica.



### 3.2 SINAIS CLÍNICOS

Em geral, as crianças afetadas pela MPS I ou II apresentam manifestações clínicas comuns, de gravidade variável. Ao nascimento, as crianças afetadas parecem normais, apresentando apenas um leve retardo do desenvolvimento nos primeiros meses de vida, em casos de formas severas. O exame físico, entretanto, pode revelar hepatoesplenomegalia, corrimento nasal crônico e dificuldade respiratória. Alterações ósseas, como cifose acentuada, podem aparecer ainda nos primeiros meses de vida em algumas MPS. Após o primeiro ano, os traços faciais grosseiros começam a se mostrar mais evidentes. A cabeça é habitualmente maior do que o normal, com saliências ósseas frontais; a sutura sagital é proeminente e a sutura metópica visível. A raiz do nariz é reduzida, e este é largo; e a boca permanece freqüentemente aberta, com a língua alargada (macroglossia) aparente (Wraith, 1995).

A opacificação da córnea pode ser observada em algumas MPS e pode ser detectada por volta de um ano de idade. Deficiências auditivas são igualmente comuns a todos os tipos de MPS, mas são ainda mais evidentes na doença de Hunter. Freqüentemente, as crianças apresentam hérnias umbilicais ou inguinais. Também estão presentes a hepatoesplenomegalia e a laxité dos movimentos articulares (Wraith, 1995).

As crianças com MPS apresentam geralmente um retardo de crescimento, malgrado um avanço durante o primeiro ano de vida. Entretanto, nas doenças de Sanfilippo (MPS III) e Scheie (Hurler na sua forma mais atenuada), o crescimento não é afetado. Muitas crianças são afetadas ainda em etapas precoces do desenvolvimento psicomotor. Em muitos tipos de MPS, o estado do paciente se agrava progressivamente após seu primeiro ano de vida, e estas crianças tornam-se rapidamente deficientes e com retardo mental. Elas necessitam de cuidados médicos e de enfermagem, já que perdem os movimentos e morrem, em geral, antes ou durante os primeiros anos da adolescência. Entretanto, o retardo mental não está associado a todos os tipos de MPS. Os pacientes com doença de Hurler-Scheie, Scheie, Maroteaux-Lamy e Morquio não apresentam neurodegeneração (Neufeld and Muenzer, 2001). Por outro lado, o retardo mental severo caracteriza a doença de Hurler (MPS I), formas severas da doença de Hunter (MPS II) e todos os tipos da doença de Sanfilippo (MPS III).

### 3.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da MPS é sugerido pelos sinais clínicos, tal como as características faciais, o retardo do desenvolvimento, a hepatoesplenomegalia e a disostose múltipla revelada por radiografia.

O aumento de GAGs na urina permite a confirmação de uma suspeita clínica de MPS. A determinação qualitativa e quantitativa de GAGs na urina pode auxiliar no diagnóstico específico da doença. Mas, a confirmação final do diagnóstico está na determinação da atividade enzimática, que se mostra deficiente em homogenizados de fibroblastos ou de leucócitos, através de testes simples e sensíveis. Após a descoberta da enzima deficitária, pode-se seguir a pesquisa de mutações (Hopwood and Morris, 1990).

Após a descoberta de um antecedente familiar, é possível disponibilizar um diagnóstico pré-natal sistemático às famílias. Há duas alternativas: a análise de atividade enzimática no trofoblasto ou a pesquisa de mutações. No caso de coleta de líquido amniótico em idade gestacional mais tardia, pode-se fazer a pesquisa de glicosaminoglicanos no mesmo, extrair DNA para análise de mutações e realizar dosagem da atividade enzimática diretamente no líquido.

### 3.4 GENÉTICA E PREVALÊNCIA

As MPS, com exceção da doença de Hunter (MPS II), transmitem-se de forma autossômica recessiva. A doença de Hunter é ligada ao cromossoma X. Os loci de genes que codificam enzimas lisossomais implicadas no catabolismo de GAGs já foram identificados. Além disso, atualmente estes genes já foram também clonados. A variabilidade mutacional poderia explicar, em parte, a variabilidade clínica observada nas MPS, e poderia permitir o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo. Através de análises de bioinformática, as predições sobre a estrutura dos domínios catalíticos da  $\beta$ -glucuronidase, da  $\beta$ -mannosidase, da  $\beta$ -glucocerebrosidase, da  $\beta$ -galactosidase e da  $\alpha$ -L-iduronidase foram estabelecidas e permitiram a proposição de explicações sobre os efeitos moleculares das mutações descritas nos pacientes afetados por estas diferentes doenças.

A frequência das MPS não está claramente estabelecida. Dois estudos australianos mostram que dentre as MPS, a doença de Hurler-Scheie (MPS I) é a mais frequente (Nelson, 1997; Meikle et al., 1999), enquanto apenas um indivíduo

afetado pela MPS VII (doença de Sly) tenha sido descrito (Meikle et al., 1999). Embora, dados de 963 casos diagnosticados nos Países Baixos também tenham sido publicados (Poorthuis et al., 1999). A prevalência conjunta de todas as MPS é de 4,5 nascimentos em 100. 000. De todos os casos diagnosticados, a MPS I é a mais freqüente, correspondendo a 25% dos casos, com uma freqüência de 1,19 em 100. 000 nascimentos (Meikle *et al.*, 1999).

### 3.5 DISFUNÇÕES SECUNDÁRIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A fisiopatologia das manifestações neurológicas das MPS é pouco conhecida. Em vários tipos de MPS, observa-se uma neurodegeneração severa, mas a razão pela qual algumas destas doenças são mais afetadas ainda não foi bem esclarecida. Os danos neurológicos são predominantes nas MPS I (doença de Hurler), MPS II (doença de Hunter) e MPS III (doença de Sanfilippo), mas estão igualmente presentes na MPS VII (doença de Sly). A histopatologia do SNC revela uma sobrecarga característica de GAGs nos neurônios, nas células gliais e nas células perivasculares (Neufeld and Muenzer, 2001). As lesões de depósito lisossomal observadas no SNC não são pontuais.

Contudo, os mecanismos moleculares e celulares pelos quais a sobrecarga lisossomal de GAGs leva à neurodegeneração não são conhecidos e não sabemos se este processo é pontual ou não.

Como visto previamente, uma deficiência numa enzima lisossomal implicada no catabolismo de GAGs conduz antes de mais nada a um acúmulo de metabólitos não degradados, HS, DS, KS e/ou CS no lisossoma. Mudanças secundárias nas funções metabólicas e celulares podem igualmente ocorrer no SNC. A relação entre estas modificações e suas consequências nas disfunções neurológicas não está elucidada.

### 3.6. AUMENTO SECUNDÁRIO DE OUTRAS ENZIMAS LISSOSSOMAS

As outras enzimas lisossomais têm, em geral, uma atividade enzimática aumentada, o que é uma característica comum às doenças de depósito lisossomal (Neufeld and Muenzer, 2001). Esta elevação secundária é observada no soro, nos fibroblastos e na maior parte dos tecidos de pacientes MPS (Constantopoulos and Dekaban, 1978; Hultberg *et al.*, 1980; Karageorgos *et al.*, 1997; Meikle *et al.*, 1997), mas também no SNC de modelos murinos MPS I, IIIB e VII.

No cérebro destes modelos murinos (Bhaumik *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 2002), foi observado um aumento dos níveis da  $\beta$ -hexosaminidase A, da  $\beta$ -hexosaminidase total, da  $\beta$ -glucuronidase, da  $\beta$ -galactosidase, da  $\alpha$ -mannosidase, da  $\alpha$ -galactosidase A, da  $\alpha$ -glucosidase e da  $\alpha$ -fucosidase. No entanto, certas enzimas podem às vezes estar diminuídas como é o caso da neuraminidase. Em função dos subgrupos de MPS e dos tecidos envolvidos, as enzimas afetadas diferem.

Há uma hipótese de que esta hiperatividade secundária das outras enzimas lisossomais possa ser devida quer a uma regulação positiva das enzimas nas vias afetadas, como uma forma de compensação, quer simplesmente à hipertrofia do sistema lisossomal (Winchester, 2001a). Um estudo sobre fibroblastos de pacientes permitiu demonstrar que a biogênese lisossomal é um processo controlado. De fato, uma regulação positiva das enzimas lisossomais está associada a um aumento dos níveis de RNA mensageiros que codifica para estas proteínas, sugerindo que a síntese e/ou a estabilidade dos RNA mensageiro sejam alteradas em resposta à sobrecarga lisossomal (Karageorgos *et al.*, 1997). Há relatos de que a sobrecarga GAGs nos lisossomas de leucócitos, *in vitro*, pode alterar a função lisossomal formando complexos com as enzimas lisossomais e inibindo assim a atividade digestiva das hidrolases lisossomais (Avila and Convit, 1975).

O aumento destas enzimas pode ser encarado como indicador bioquímico da evolução da patologia, ainda que nenhuma correlação entre o aumento enzimático e a quantidade de sobrecarga lisossomal tenha sido observada. A superexpressão destas enzimas lisossomais nos danos neurológicos seria consequência da neurodegeneração, desempenhando um papel na eliminação dos restos e/ou na remodelagem dos tecidos degenerados? Contudo, estas enzimas podem igualmente desempenhar um papel importante favorecendo a degradação das moléculas essenciais para a sobrevivência neuronal. Os mecanismos bioquímicos que conduzem à compreensão de tal desregulação permanecem por se esclarecer.

### 3.7. AUMENTO SECUNDÁRIO DE PROTEÍNAS LISSOSSOMAIS

Proteínas lisossomais encontradas no plasma são consideradas como o resultado de uma hipertrofia do sistema lisossomal. Quantidades elevadas das formas solúveis de LAMP-1 e de LAMP-2 foram observadas no soro, com uma forte correlação entre elas (Karageorgos *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998). Estas proteínas são utilizadas para orientar o diagnóstico das doenças de depósito ao nascimento.

No córtex cerebral de pacientes MPS IIIB, CLN e da forma severa de MPS II, observou-se níveis elevados de dolichol, molécula lipídica transmembrana do retículo endoplasmático rugoso (Sakakihara *et al.*, 1994).

Nos cérebros de pacientes MPS I e IIIB, de modelos caprinos de MPS IIID e murinos de MPS VII, observou-se um aumento, de cerca de três vezes, do peptídeo beta-amilóide citoplasmático em relação aos cérebros normais (Ginsberg *et al.*, 1999). O acúmulo de GAGs, associado ao acúmulo do peptídeo beta-amilóide, contribui para o disfuncionamento e para a morte das células afetadas nestas doenças, mas não provoca a formação de placas senis como na doença de Alzheimer.

Um aumento de diferentes catepsinas (catepsinas D, S, Z, L, B) também foi descrito em diversos modelos murinos de doenças lisossomais (MPS I, IIIB, VII e a doença de Niemann- Pick tipo C) (Wada *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2002; German *et al.*, 2002). Estas catepsinas são expressas nas células da linhagem monócito/macrófago, o que sugere a sua implicação na inflamação do SNC. Com efeito, elas foram descritas em quantidades mais importantes em outras doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999).

Ainda não foi claramente estabelecido porque certas proteínas ou enzimas acumulam-se nas MPS e não em outras doenças desse tipo. As doenças de sobrecarga lisossomal ocorrem na sequência de uma deficiência enzimática que provoca um acúmulo de substrato não degradado nos lisossomas, que pode conduzir a um acúmulo de outras enzimas. No entanto, proteínas, além das hidrolases ácidas podem igualmente ser aumentadas, sugerindo que vários fatores estejam implicados nesta hipertrofia dos sistemas endossomal/lisossomal.

### 3.8 CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS

Nas MPS que induzem a um atraso mental, o substrato que se acumula majoritariamente é o HS (quadro 1). Os HSPG, como descrito previamente, estão presentes na membrana celular e na matriz extracelular. Os HS desempenham um papel de reguladores na migração celular, na orientação axonal, na sinaptogênese e na plasticidade estrutural das células neuronais (Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Brickman *et al.*, 1998; Bandtlow and Zimmermann, 2000). Os HS atuam igualmente em diversos processos fisiológicos, que incluem a adesão das células neuronais, a proliferação das células de Schwann, a ativação do crescimento de neuritos, a interação com o FGF e o seu receptor (Rapraeger *et al.*, 1991; Ruoslahti and Yamaguchi, 1991; Yayon *et al.*, 1991; Nurcombe *et al.*, 1993; Margolis and Margolis, 1994; Turnbull *et al.*, 2001).

**Tabela 1.** Classificação das mucopolissacaridoses (adaptado de Harper, 1998).

<b>Mucopolissacaridoses</b>	<b>Sigla</b>	<b>Enzima Afetada</b>	<b>GAGs Acumulados</b>
Hurler			
Hurler-Scheie	MPS I	$\alpha$ -L-iduronidase	Dermatan sulfato
Scheie			Heparan sulfato
Hunter	MPS II	Iduronato sulfatase	Dermatan sulfato
			Heparan sulfato
Sanfilippo A	MPS III A	Heparan sulfato N-sulfatase (sulfamidase)	Heparan sulfato
Sanfilippo B	MPS III B	$\alpha$ -N-Acetilglicosaminidase	Heparan sulfato
Sanfilippo C	MPS III C	Acetiltransferase	Heparan sulfato
Morquio A	MPS IV A	Galactose 6-sulfatase	Queratan sulfato
			Condroitin 6-SO <sub>4</sub>
Morquio B	MPS IV B	$\beta$ -Galactosidase	Queratan sulfato
Maroteaux-Lamy	MPS VI	N-Acetilgalactosamina 4-sulfatase (arilsulfatase B)	Dermatan sulfato
			Dermatan sulfato
Sly	MPS VII	$\beta$ -Glicuronidase	Heparan sulfato
			Condroitin 4- e 6-SO <sub>4</sub>
MPS IX	MPS IX	Hialuronidase	Ácido Hialurônico

#### 4. MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I

A MPS I é um dos tipos de MPS mais comuns (Meikle *et al.*, 1999) e melhor caracterizados, com uma incidência de 1:120.000 nascidos vivos. É uma doença autossômica recessiva resultante de mutações (mais de 75 mutações já identificadas) no gene que codifica a exohidrolase lisossomal  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), que degrada os GAGs heparan sulfato (HS) e dermatan sulfato (DS). A deficiência de IDUA leva à falha na remoção dos resíduos de ácido  $\alpha$ -L-idurônico da extremidade não-reduzida destes GAGs. Desta forma, estes compostos, que são constituintes importantes da matriz extracelular, dos fluidos das articulações e do tecido conjuntivo de todo o organismo, se acumulam progressivamente no lisossoma, levando à disfunção das células, tecidos e órgãos, por mecanismos fisiopatológicos ainda não muito bem conhecidos, e à secreção urinária de GAGs parcialmente degradados (Neufeld and Muenzer, 2001). Algumas mutações em homozigose (ex. W420X e Q70X) resultam em perda total da atividade enzimática, levando ao fenótipo mais grave da doença (Síndrome de Hurler) (Hartung *et al.*, 2004).

Os pacientes com MPS I apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas variando da forma mais grave, a Síndrome de Hurler, a uma forma mais atenuada, a Síndrome de Scheie. Entre estes dois extremos está a Síndrome de Hurler-Scheie, uma forma clínica intermediária da doença. Pacientes com a Síndrome de Hurler geralmente são diagnosticados nos primeiros anos de vida e, se não forem tratados, comumente chegam ao óbito antes dos 10 anos de idade devido à insuficiência cardíaca ou a infecções respiratórias recorrentes (Hartung *et al.*, 2004; Fuller *et al.*, 2005).

A doença é progressiva, com sintomas que incluem deformidades esqueléticas e nas articulações, características faciais grosseiras, opacificação da córnea, hérnia, doenças cardíacas, hepatoesplenomegalia, fadiga, hidrocefalia, macroglossia, e retardo mental. Pacientes com a Síndrome de Scheie apresentam um fenótipo mais atenuado, com manifestações clínicas variáveis e manifestação tardia destes últimos sintomas clínicos, mas estes pacientes podem ter inteligência, estatura e expectativa de vida, normais. As manifestações clínicas dos pacientes com a Síndrome de Hurler-Scheie são amplas e estão entre os dois extremos das Síndromes de Hurler e de Scheie (Zheng *et al.*, 2003; Fuller *et al.*, 2005).

As terapias atualmente propostas para MPS I incluem a reposição enzimática e o transplante alogênico de medula óssea. A reposição enzimática com uma  $\alpha$ -L-iduronidase humana recombinante (Aldurazyme, laronidase, rhIDU, EC 3.2.1.76) foi aprovada para administração intravenosa nos EUA e na Europa em 2003 (Wraith *et al.*, 2004). O tratamento reduz o depósito lisossomal de GAG em modelos animais e resulta em alguma melhora dos sintomas clínicos de indivíduos tratados (Shull *et al.*, 1994; Kakkis *et al.*, 2001a; Kakkis *et al.*, 2001b; Wraith *et al.*, 2004). No entanto, a enzima exógena provavelmente não atravessa a barreira hemato-encefálica dos pacientes, e, portanto pode não tratar as manifestações do SNC, incluindo hidrocefalia, compressão da coluna espinhal e retardo mental. Além disso, este é um método de alto custo (Kakkis *et al.*, 2001a; Kakkis *et al.*, 2001b). Já o transplante de medula óssea de um indivíduo normal para um afetado, procedimento dificultado pelo problema de encontrar doador com HLA compatível (Vellodi *et al.*, 1997), tem levado a bons resultados no tratamento de tecidos somáticos e do sistema nervoso central (SNC) (Braunlin *et al.*, 2003). Para o tratamento efetivo dos pacientes com Síndrome de Hurler, através do transplante de medula óssea, é essencial o diagnóstico e o tratamento precoces, antes da manifestação de patologias irreversíveis. Segundo Krivit *et al.* (1995), a microglia, derivada de medula óssea recém-enxertada, tem sido considerada o veículo mais provável para a atividade enzimática cerebral após o transplante de medula, e que tem levado à amenização dos sintomas cerebrais.

Alguns outros investigadores observaram que, após o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, os macrófagos derivados do tecido doador secretam a  $\alpha$ -L-iduronidase normal, melhorando as manifestações clínicas da doença e prolongando a expectativa de vida (Peters *et al.*, 1998a; Peters *et al.*, 1998b; Staba *et al.*, 2004). No entanto, tecidos como cérebro e sistema esquelético, que são particularmente afetados na MPS I, não são satisfatoriamente corrigidos após o transplante (Pan *et al.*, 2005).



### **PARTE III - ABORDAGENS TERAPÊUTICAS**

Existem atualmente quatro níveis possíveis de intervenção terapêutica para tratar as doenças de depósito lisossomal (DLD). Primeiramente, o tratamento sintomatológico; em segundo lugar, a reposição da enzima deficitária, quer por reposição enzimática, quer por transplante de medula óssea; em terceiro lugar, a redução da síntese de substrato ou a disseminação dos produtos acumulados; por último, a correção do gene que determina o déficit enzimático. A eliminação dos produtos acumulados é aplicável apenas nos defeitos de transporte, nos quais metabólitos de baixo peso molecular acumulam-se nos lisossomas. Por exemplo, o acúmulo intra-lisossomal de cisteína, nas cistinoses, pode ser diminuída através da administração de um medicamento via oral, a cisteamina, que reage com a cistina acumulada para formar um complexo dissulfídico. Este complexo assemelha-se estruturalmente a um composto de lisina, o que lhe permite ser transportado para fora do lisossoma pelo transportador da lisina. Prescrita precocemente, a cisteamina pode prevenir a deterioração renal ligada à doença (Markello *et al.*, 1993).

Os tratamentos sintomatológicos não corrigem o déficit primário da doença, mas melhoram a qualidade de vida dos pacientes. Estes tratamentos devem ter em conta todos os danos orgânicos.

#### **1. TERAPIA SISTÊMICA**

##### **1.1 TERAPIA DE REPOSIÇÃO ENZIMÁTICA (TRE)**

Este tratamento consiste em administrar a enzima humana recombinante, por via intravenosa, no organismo. Este conceito de terapia por reposição enzimática foi descoberto a partir da observação “de uma correção” *in vitro* entre células normais e células deficitárias (Fratantoni *et al.*, 1968; Sando and Neufeld, 1977). Com efeito, as enzimas lisossomais presentes no meio extracelular são internalizadas via MPR, ou outros receptores oligossacarídicos localizados na superfície celular, e, em seguida, são dirigidas aos lisossomas. Um mínimo nível de atividade enzimática, inferior a 1% da atividade enzimática normal, já é suficiente para restabelecer o metabolismo celular. Assim, pequenos níveis de atividade enzimática exógena podem ser suficientes para chegar aos lisossomas e atuar na degradação do substrato acumulado (Fratantoni *et al.*, 1969).

### Estudos em modelos animais de MPS

Nas MPS, estudos foram realizados em modelos animais de MPS I (cão e gato) (Shull *et al.*, 1994; Kakkis *et al.*, 1996; Kakkis *et al.*, 2001b), de MPS IIID (cabra) (Downs-Kelly *et al.*, 2000), de MPS VI (gato) (Crawley *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 1997; Byers *et al.*, 1997; Crawley *et al.*, 1997; Bielicki *et al.*, 1999) e de MPS VII (camundongos) (Sands *et al.*, 1994; Vogler *et al.*, 1996; Sands *et al.*, 1997; Vogler *et al.*, 1998; Vogler *et al.*, 1999; Sands *et al.*, 2001).

Um primeiro estudo foi publicado com o modelo canino de MPS I, com baixas doses de enzima infundida todas as semanas durante três meses, via intravenosa (0,1 mg/kg ou seja 25.000 unidades) (Shull *et al.*, 1994). Os resultados revelam uma boa distribuição da enzima em diversos tecidos e uma redução das lesões de depósito lisossomal no fígado, no baço e nos rins, apesar do aparecimento de anticorpos contra a proteína, algumas semanas após o tratamento em todos os animais. Contudo, o coração, o SNC e a córnea não apresentam melhoria.

Recentemente, Kakkis e os seus colaboradores desenvolveram um método de tolerização nos cães MPS I, baseado na injeção de medicamentos (ciclosporina A e azatioprina) durante 60 dias em associação com a infusão da enzima em baixas doses. Estes cães, tolerizados e tratados por enzimoterapia, mostram fraca resposta imune pelos 6 meses seguintes ao tratamento, mesmo na ausência de imunossupressores (Kakkis *et al.*, 2004). Os estudos no modelo felino de MPS I mostram resultados similares aos estudos no modelo canino, com desenvolvimento de resposta imune contra a proteína observada nos gatos tratados com doses elevadas (0,5mg/kg soit 125.000 unités/kg) (Kakkis *et al.*, 2001b). Os gatos tratados ao nascimento tiveram um melhor prognóstico se comparados com os gatos tratados em idade mais avançada (Brooks *et al.*, 1997; Brooks, 1999). Além disso, o tratamento neonatal previne a doença neurológica, dado que a barreira hemato-encefálica não está completamente formada ao nascimento (Sands *et al.*, 1997). Outro estudo mostrou que a injeção de enzima a partir do nascimento pode prevenir os danos das funções auditiva, da memória e da aprendizagem (O' Connor *et al.*, 1998).

## Ensaio clínico em MPS I

### ► Ensaio clínico de Fase I/II em MPS I

O primeiro ensaio clínico foi realizado por uma indústria farmacêutica, a BioMarin (Novato, Califórnia, EUA), durante mais de um ano em 10 pacientes com idade média de 12 anos (Kakkis *et al.*, 2001a). Estes pacientes não apresentavam danos neurológicos essenciais exceto um (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/acwhatsnew.htm>). Este estudo indica que a administração da enzima, a IDUA humana recombinante, secretada por células CHO (125 000 unités/kg), conduz à melhoria bioquímica e clínica dos pacientes. Com efeito, a normalização das dimensões do fígado e do baço, bem como uma redução da excreção de GAG urinários, foi observada a partir de duas semanas após o início do tratamento. Uma melhoria significativa é notada igualmente nas articulações dos joelhos, cotovelo e ombros. A opacidade da córnea não mostra uma melhoria significativa. Comparado com os pacientes que têm recebido tratamento placebo, os pacientes tratados com a enzima chegam a ganhar peso e vêem uma melhoria no seu crescimento. Os resultados viscerais são semelhantes aos observados nos pacientes tratados por transplante de medula óssea com sucesso (Peters *et al.*, 1996). Os pacientes receberam um tratamento profilático antes do início da terapia.

As infusões foram bem toleradas, embora sintomas de hipersensibilidade e urticária, transitórios, tenham sido relatados em alguns pacientes durante as infusões. Tais sintomas, no entanto, desapareciam nas horas seguintes. Observou-se reação imune contra a enzima em 4 pacientes, em dois dos quais, os anticorpos persistiam além de 26 semanas. Em contrapartida, os títulos eram relativamente mais fracos comparados com os observados no modelo canino. Ademais, tais anticorpos não apresentavam efeito neutralizador.

### ► Ensaio clínico de Fase III em MPS I

Este ensaio de fase III foi iniciado com o objetivo de avaliar a segurança e a eficácia do tratamento com a enzima recombinante. Foi conduzido por duas sociedades farmacêuticas, a BioMarin (Novato, Califórnia, EUA) e a Genzyme (Cambridge, Massachusetts, EUA) (Wraith *et al.*, 2004). Este estudo internacional, que ocorreu em 5 localidades da Europa e uma da América do Norte, consistiu em

um estudo duplo-cego com 45 pacientes, 22 dos quais receberam 100 unidades/kg da enzima recombinante, Laronidase (Aldurazyme), e 25 um tratamento placebo, durante 26 semanas todas as semanas. Os pacientes tratados têm uma média de idade de 15 anos e 82% deles apresentavam fenótipo intermediário (doença Hurler/Scheie). O benefício do tratamento foi avaliado todos os meses comparando os sinais clínicos e os resultados bioquímicos antes e após o tratamento. Os resultados preliminares deste estudo mostram uma diminuição da excreção urinária de GAGs a partir de 4 semanas de tratamento, bem como uma redução da hepatomegalia. Diferenças significativas na caminhada e na apnéia do sono foram observadas entre os pacientes tratados e os que têm recebido placebo. A maior parte dos pacientes tratados desenvolve anticorpos contra a proteína recombinante sem efeitos clínicos aparentes (Wraith *et al.*, 2004).

#### Resposta imune contra a enzima na terapia de reposição enzimática

Respostas imunes contra a enzima infundida foram algumas vezes observadas nos estudos em modelos animais e no único ensaio clínico humano. A presença de anticorpos pode ter efeitos desfavoráveis durante o tratamento, podendo provocar reações de hipersensibilidade ou anafiláticas e/ou uma alteração da melhora clínica.

A resposta imune ao tratamento de reposição enzimática pode depender de numerosos fatores, que incluem as propriedades da proteína terapêutica (dimensão, glicosilação, homologia de sequência com outras proteínas), a via de administração, a frequência do tratamento, a velocidade de infusão, o contexto genético do paciente, a presença da proteína mutante sob forma residual e/ou as diferenças estruturais entre a proteína mutante e a normal.

Nos modelos animais tais reações foram observadas em 100% dos cães MPS I tratados (Kakkis *et al.*, 1996), 100% dos camundongos MPS I (Brooks, 1999), 30% dos gatos MPS VI (Crawley *et al.*, 1996; Crawley *et al.*, 1997), 100% dos camundongos MPS VII, e em certos pacientes com doença de Gaucher (15%) (Pastores *et al.*, 1993; revisão em Brooks *et al.*, 2003). No modelo felino MPS VI e no canino MPS I, a produção de anticorpos é equivalente, qualquer que seja a

origem da enzima (animal ou humana), o que sugere que a resposta humoral não seja espécie-específica.

Vários efeitos desfavoráveis podem ser associados na resposta imune. Primeiramente, reações de hipersensibilidade ou anafiláticas, que podem ocorrer durante ou após a administração da enzima. As reações de hipersensibilidade foram observadas igualmente em pacientes e modelos animais tratados, mas as reações anafiláticas são muito raras. Estas reações podem ser controladas reduzindo-se a velocidade de infusão da enzima.

Outro efeito desfavorável é sobre a eficácia do tratamento. Os anticorpos neutralizadores impedem um tráfego eficaz da enzima aos lisossomas. As enzimas ligadas aos anticorpos são provavelmente desviadas e o complexo é degradado, fazendo com que a proteína seja apresentada posteriormente como um antígeno.

Alterações farmacocinéticas menos evidentes também foram observadas em alguns pacientes. Camundongos imunizados que receberam infusão intravenosa de IDUA mostraram alteração na distribuição da enzima, bem como de seus alvos nos compartimentos subcelulares, e que a enzima era rapidamente inativada e degradada, na presença de títulos elevados de anticorpos (Turner *et al.*, 1999). Contudo, a infusão de uma dose elevada de enzima terapêutica nos pacientes com doença de Gaucher ou com MPS I induz a uma tolerância, sugerindo que esta resposta imune transitória não tem consequências em longo prazo para o tratamento (Rosenberg *et al.*, 1999; Kakavanos *et al.*, 2003).

A TRE apresenta pontos fracos, como a resposta imune, mas também a impossibilidade para a proteína de atravessar a barreira hemato-encefálica, o que limita a sua utilização às doenças que não apresentam danos neurológicos. Além disso, a produção de enzima é dispendiosa. Contudo, este tratamento, mesmo nas doenças neurológicas, pode propiciar ao paciente, condições de esperar um doador para transplante de medula óssea e também reduzir o depósito orgânico e sistêmico, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes.

## 1.2. TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O transplante de medula óssea (TMO) visa reconstituir o sistema hematopoiético de um paciente com as células de um doador imuno- compatível. O efeito benéfico

do TMO deve-se à substituição dos macrófagos deficitários dos pacientes por macrófagos que provêm da medula do doador, e que constituem uma fonte de enzima normal capaz de corrigir diferentes sítios de depósito. Assim as células (monócitos) podem migrar até o fígado, os pulmões, o peritônio e, eventualmente, ao nível dos ossos e do SNC, em certas condições. A difusão da enzima no cérebro é quase impossível devido barreira à hemato-encefálica. No entanto, todas as doenças de depósito lisossomal, onde o TMO alogênico é indicado, os limites essenciais deste tratamento são o risco vital do transplante e a dificuldade para encontrar doadores compatíveis.

#### Transplante de medula óssea alogênico

Alguns pacientes com MPS I ou MPS II beneficiam-se do TMO, com redução da hepatoesplenomegalia, da hipertrofia cardíaca e das obstruções das vias aéreas superiores, assim como uma estabilização dos sintomas gerais (Walkley *et al.*, 1994; Hoogerbrugge *et al.*, 1995; Vellodi *et al.*, 1997; Guffon *et al.*, 1998; Krivit *et al.*, 1999; Vellodi *et al.*, 1999; Seto *et al.*, 2001; Malatack *et al.*, 2003).

As lesões ósseas também se estabilizam, embora sem regressão completa. Embora as células da linhagem monocitária/macrofágica derivadas dos doadores possam penetrar no SNC, tal difusão parece não ser suficiente para corrigir os danos neurológicos, em especial se tais danos já estão presentes quando do transplante. Contudo, o TMO é indicado para tratar os pacientes MPS I, se estes têm um genótipo que conduz ao fenótipo tipo Hurler severo e que têm menos de 2 anos, sem sintomas neurológicos importantes (Vellodi *et al.*, 1997). Com efeito, neste caso, observa-se a parada ou retardo das manifestações neuropsicológicas e psicomotoras (Vellodi *et al.*, 1997; Krivit *et al.*, 1998).

Contudo diferentes inconvenientes ainda persistem. Doadores haplo-idênticos e geno-idênticos são raros. O tratamento imunossupressivo é necessário. E a eficácia em longo prazo desta abordagem terapêutica às vezes é colocada em risco devido à possibilidade de uma rejeição do transplante contra o hospedeiro (GVH), que ocorre em aproximadamente 10 a 15% dos casos. Por último, a taxa de mortalidade continua entre 10 e 20% (Hoogerbrugge *et al.*, 1995). Numerosas famílias recusam o TMO devido aos riscos elevados de mortalidade e de morbidade.

### Transplante de medula óssea singênico com células geneticamente modificadas

O desenvolvimento de vetores virais para a terapia gênica possibilitou a transferência de genes *ex vivo* em células autólogas em cultura antes de implantá-las no organismo. As células, uma vez re-implantadas, secretam continuamente a enzima em falta.

Experiências de transplante de células geneticamente modificadas utilizando fibroblastos (Wolfe *et al.*, 1990), macrófagos (Eto and Ohashi, 2000; Ohashi *et al.*, 2000) e células de linhagem hematopoiética (Wolfe *et al.*, 1992; Marechal *et al.*, 1993; Biffi *et al.*, 2004) mostraram uma correção das lesões de depósito lisossomal, sobretudo, no fígado e baço, mesmo com poucas células injetadas.

Contudo, nenhum efeito neurológico foi observado ainda que, às vezes, alguma atividade enzimática pudesse ser detectada no SNC.

Estudos similares foram realizados com fibroblastos e células de linhagem mesenquimal provenientes de pacientes com MPS I, modificados por transferência gênica através de vetores retrovirais (Anson *et al.*, 1992; Baxter *et al.*, 2002); e com células de linhagem hematopoiética (Krause *et al.*, 2001; Biffi *et al.*, 2004); bem como com fibroblastos provenientes de pacientes com MPS VI (Peters *et al.*, 1991). Estes estudos não mostram diferença em relação ao TMO.

Em contrapartida, a vantagem deste tipo de abordagem terapêutica é que as células provêm do próprio paciente, diminuindo assim os problemas ligados a qualquer transplante, como a escassez dos doadores e a rejeição do doador contra o hospedeiro.

#### 1.3. TRANSPLANTE DE SANGUE DE CORDÃO

O transplante de sangue de cordão umbilical parece ser tão eficaz quanto o transplante de medula óssea (Staba *et al.*, 2004). Com efeito, 20 pacientes com doença de Hunter e uma média de idade de 16 meses (10 meninos e 10 meninas) receberam um transplante de sangue de cordão, proveniente de doadores não aparentados, associado à quimioterapia. O acompanhamento por mais de dois anos mostrou que 85% das crianças sobreviviam com um quimerismo total do doador e uma atividade enzimática IDUA normal no sangue periférico. Este

transplante provocou uma diminuição dos sintomas orgânicos da doença, estabilizou as anomalias esqueléticas e as funções neurocognitivas. A vantagem deste transplante em relação ao transplante de medula óssea é que não há necessidade de um doador histocompatível e a doença de rejeição do doador contra o hospedeiro é fraca.

## **2. TERAPIA GÊNICA**

A terapia gênica (TG) é uma estratégia clínica que se baseia na transferência de genes com propósito terapêutico. Ela é baseada no conceito de que a expressão de um gene exógeno (transgene) é capaz de modificar o fenótipo das células, tecidos ou órgãos alvo. A terapia gênica foi inicialmente projetada para corrigir permanentemente doenças monogênicas, como a fibrose cística, a imunodeficiência combinada severa, ou a distrofia muscular. Entretanto, os alvos para terapia gênica têm se expandido e atualmente incluem abordagens para eliminar ou modificar células malignas, modificar o sistema de defesa do hospedeiro, ou “re-engenheirar” órgãos afetados, utilizando genes com papel no desenvolvimento do órgão (Worgall, 2005).

A terapia gênica surgiu como consequência dos avanços na biologia molecular e biotecnologia, como a tecnologia do DNA recombinante e a clonagem gênica. O princípio da terapia gênica apresenta vantagens sobre outros tipos de terapia, que incluem: (i) correção da causa genética de uma doença; (ii) tratamento específico das células e tecidos afetados; e (iii) tratamento em longo prazo após uma única aplicação. Esses princípios teóricos fazem deste um tratamento promissor (Rubanyi, 2001).

O principal objetivo da TG é a transferência *in vivo* (ou *ex vivo*) de material genético para os tecidos-alvos de maneira segura e bem-sucedida. O objetivo de cada sistema de “entrega” varia de acordo com a aplicação. Por exemplo, para doenças relacionadas à disfunção de um gene, como a hipercolesterolemia, é necessário obter uma expressão prolongada e permanente, enquanto para a maioria das estratégias de terapia gênica para o câncer, curtos períodos de expressão são suficientes (El-Aneed, 2004).

A terapia gênica começa com a introdução de um vetor apropriado (viral, não-viral ou baseado em célula) no organismo, seja localmente (injeção direta no tecido) ou



sistemicamente (injeção endovenosa). O vetor precisa encontrar seu tecido alvo, penetrar nas células-alvo e passar pelo citoplasma para entrar no núcleo. Uma vez no núcleo, o transgene terapêutico precisa ser transcrito e o seu RNA mensageiro precisa ser adequadamente traduzido na proteína terapêutica. A proteína, por sua vez, atua no seu receptor, seja na própria célula em que foi produzida (mecanismo autócrino), em células vizinhas (mecanismo parácrino) ou em locais distantes através de dispersão pela corrente sanguínea (mecanismo endócrino). Finalmente, depois de interagir com seu receptor, a proteína precisa induzir o efeito biológico apropriado, que irá resultar nos benefícios terapêuticos desejados (Rubanyi, 2001).

Os fatores gerais necessários para que a TG seja bem-sucedida são os mesmos para qualquer nova modalidade terapêutica: fatores técnicos (“entrega” e expressão gênica), clínicos (eficácia terapêutica e segurança) e sócio-econômicos. No entanto, existem fatores técnicos específicos únicos da terapia gênica, como escolha do gene terapêutico apropriado, sistemas de entrega e sistemas de regulação da expressão gênica para controlar o nível e o tempo de expressão da proteína terapêutica.

Os sucessos, terapêutico e sócio-econômico, da TG incluem a necessidade de que os benefícios sejam maiores que os riscos e o oferecimento de vantagens em relação aos tratamentos convencionais (Rubanyi, 2001).

O primeiro ensaio clínico de TG aprovado foi realizado em 1990 em crianças com a Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa (SCID), através da transferência do gene da adenosina deaminase em linfócitos isolados destes pacientes (transferência gênica *ex vivo*). Desde então, mais de 5000 pacientes em todo o mundo têm sido tratados em mais de 400 protocolos clínicos. No entanto, até hoje a terapia gênica ainda não conseguiu cumprir sua promessa original. Apesar do entusiasmo inicial, as experiências clínicas ainda indicam uma eficácia terapêutica insuficiente, aliada a um aumento das discussões acerca de questões éticas e de segurança (Verma and Somia, 1997; Rubanyi, 2001).

Os dois eventos adversos mais sérios em humanos ocorreram com a utilização de vetores adeno e retrovirais. Os vetores baseados em adenovírus induzem resposta imune do hospedeiro, e os vetores retrovirais, especificamente Moloney

(vírus da leucemia murina), podem levar ao desenvolvimento de tumores devido à sua integração ao genoma hospedeiro. Apesar destas complicações, a terapia gênica permanece viável e promissora, especialmente na era pós-genômica, após a decodificação do genoma humano e da rápida descoberta de alterações genéticas patológicas (Worgall, 2005).

No que diz respeito à terapia gênica do SNC, a cultura e a manipulação genética de neurônios maduros e de células gliais são complexas e delicadas e conduzem antes à utilização de tipos celulares alternativos. O acesso do gene terapêutico no cérebro apresenta dificuldades essenciais, como o acesso limitado e arriscado através do crânio (número de injeções limitado) bem como o volume injetado de inoculação. A intervenção cirúrgica pode igualmente induzir à hemorragia, infecção e gliose, que podem conduzir a uma crise epilética.

Além disso, a injeção é local, o que não constitui um problema nos casos de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, de Huntington ou de Alzheimer, dado que a doença é localizada numa região precisa do cérebro. Ao contrário das doenças lisossomais, cujas lesões são difusas tanto no cérebro como em outros tecidos e órgãos.

Dado que a maioria dos neurônios não se divide no cérebro adulto, a transferência de gene nestas células é limitada apenas a alguns sistemas de vetores. Os vetores virais derivados do vírus da herpes, retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e lentivirus já têm sido utilizados *in vivo* e *ex vivo* em estudos experimentais em modelos animais de doenças de depósito lisossomal. Contudo, não são todos os vetores possíveis de se utilizar para um ensaio clínico no SNC. O tropismo celular, a difusão e o transporte axonal são pontos importantes a considerar quando da utilização de um vetor. A segurança dos vetores corresponde à sua toxicidade e resposta imune que podem gerar, devido à impureza dos métodos de preparação ou às sequências virais presentes, e à integração do transgene no genoma da célula alvo.

## VETORES

### Sistemas não virais

A terapia gênica com vetores não-virais está baseada na utilização de vários métodos, físicos e químicos, que propiciam a entrada do DNA plasmidial

recombinante, contendo o gene terapêutico, nas células-alvo. Estes métodos, suas vantagens e limitações estão resumidos nos quadros 2 e 3.

**Quadro 2.** Métodos físicos de terapia gênica com vetores não-virais

Métodos		Descrição do Método	Vantagens	Limitações
Métodos Físicos	Microinjeção	Injeção direta do DNA plasmidial na célula-alvo.	Pequena quantidade de DNA necessária para a transferência.	Extremamente trabalhoso e com baixo rendimento.
	Eletroporação	Administração de DNA plasmidial com a aplicação de um campo elétrico alternado, que rompe a membrana, formando poros transientes	Altos níveis de expressão do transgene em vários órgãos.	Pode causar dano tecidual local e inflamação; depende de altas concentrações de DNA plasmidial.
	Biobalística	Sistema de aceleração através de um gás carreador para projetar a molécula de DNA associada a micropartículas de tungstênio ou ouro, para o interior das células-alvo, promovendo a expressão intracelular do DNA exógeno.	Permite a transfecção de genes complexos; ausência de citotoxicidade; eficiência de transfecção <i>in vitro</i> relativamente alta.	Uso limitado a tecidos e órgãos superficiais, como o músculo; apresenta limitações para o uso <i>in vivo</i> .

**Quadro 3.** Métodos químicos de terapia gênica com vetores não-virais

Métodos		Descrição do Método	Vantagens	Limitações
<b>Métodos Químicos</b>	<b>DNA nu</b>	Injeção direta de DNA plasmidial recombinante (não complexado a nenhuma partícula).	Sucesso na expressão do transgene (1-40%) transferido através de DNA nu por injeção hidrodinâmica* em camundongos.	Rápida degradação e neutralização por DNAses endógenas; potencial de interação eletrostática com os lipídeos aniônicos da membrana celular limitado (carga negativa da molécula); aplicabilidade clínica incerta e problemas para utilização em larga escala.
	<b>Lipoplexos</b>	Lipídeos catiônicos complexados ao DNA, que neutralizam sua carga eletrostática, possibilitando a interação DNA-membrana celular e aumentando, assim, a eficiência de transfecção.	Os lipoplexos são sistemas poderosos para introduzir plasmídeos nas células-alvo; altos níveis de expressão do transgene após administração direta ou injeção nos tecidos-alvo.	Interação com proteínas plasmáticas e outras proteínas extracelulares, que podem inativá-los devido à sua superfície hidrofóbica e catiônica; expressão indiscriminada dos transgenes nas células presentes no local da administração (atividade de membrana não-específica); baixa eficiência na transfecção de células quiescentes.
	<b>Poliplexos</b>	Complexos não-particulados formados pela ligação do DNA a polímeros catiônicos.	Idem aos lipoplexos; possibilidade de escolher a estrutura ideal do polímero para a transfecção da célula-alvo e a fácil obtenção em larga escala.	Idem aos lipoplexos

\*administração intravenosa rápida de grande volume de transfectado – até ~ 2,5 ml.

### Sistemas virais

Para a produção de um vetor viral eficiente e seguro é necessário primeiramente identificar as seqüências virais necessárias para a montagem da partícula viral, para o empacotamento do genoma viral na partícula, e para a entrega do transgene às células-alvo. Depois, os genes dispensáveis são deletados do

genoma viral para reduzir a sua patogenicidade e imunogenicidade. Por fim, o genoma viral residual e o gene de interesse (transgene) são integrados no constructo. Os vetores virais podem ou não se integrar no genoma hospedeiro. Os vetores que se integram, como os retrovirais e os adeno-associados, são capazes de promover uma expressão persistente do transgene. Já os vetores que não se integram, como o adenovírus, cujo DNA viral é mantido em forma episomal na célula infectada, levam a uma expressão transiente do transgene. Cada um destes vetores apresenta vantagens específicas e limitações, tornando-os mais ou menos adequados dependendo do objetivo de sua aplicação (Pfeifer and Verma, 2001). O vetor ideal ainda não foi descrito, mas suas características seriam:

- Produção eficiente e fácil de altos títulos de partícula viral;
- Não ser tóxico às células-alvo, nem induzir efeitos indesejáveis, como resposta imunológica contra o vetor ou o transgene.
- Capacidade de integração sítio-específica, propiciando a expressão do transgene em longo prazo, em casos específicos como nas doenças genéticas;
- Capacidade de transdução de tipos celulares específicos
- Infecção de células proliferativas e quiescentes

#### A. Adenovírus (Ad)

Os adenovírus (Ad) são vírus icosaédricos não-envelopados, cujo genoma é composto por 36 Kb de DNA. A deleção de genes essenciais, como *E1*, leva à deficiência de replicação do vírus e libera espaço para a inserção de um cassete de expressão. Os vetores baseados em Ad têm sido os mais extensivamente avaliados em estudos clínicos. As vantagens de utilização destes vetores para TG são a fácil propagação em altos títulos, a capacidade de infectar a maioria dos tipos celulares e a possibilidade de inserção de grandes fragmentos de DNA (Pfeifer and Verma, 2001). O primeiro estudo clínico com Ad para corrigir uma doença genética consistiu na administração de Ad com o gene regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR) nos pulmões de pacientes com fibrose cística. Neste estudo, o nível de expressão obtido foi de 5%, quantidade suficiente para um efeito terapêutico, mas a expressão durou poucos dias. A administração

de vetores adenovirais leva a uma significativa reposta imune, humoral e celular, contra o adenovírus. Por isso, uma grande dose de Ad pode ser fatal. De uma maneira geral, os vetores baseados em Ad têm um grande potencial para terapias que requeiram apenas uma expressão gênica transiente e nas quais a expressão permanente seja imprópria. Sendo assim, os vetores adenovirais são bastante adequados para terapia do câncer, para indução de angiogênese e, principalmente para produção de vacinas de DNA, devido às suas fortes propriedades inflamatórias e imunogênicas. Vários esforços têm sido feitos para alterar a imunogenicidade dos vetores Ad através da deleção de mais genes do genoma adenoviral, criando assim vetores dependentes de auxiliar (“helper-dependant”). Os vetores Ad dependentes de auxiliar não contêm o genoma do Ad e, por isso, apresentam menor imunogenicidade e maior persistência em modelos animais. Entretanto, estes vetores ainda estão longe de serem testados em grandes ensaios clínicos (Pfeifer and Verma, 2001; Worgall, 2005).

#### B. Vírus Adeno-Associado (AAV)

Os vírus adeno-associados (AAV) são parvovírus não-patogênicos. A família Parvoviridae é caracterizada por vírus pequenos, icosaédricos, não envelopados, e cujo genoma é constituído de DNA fita simples. O AAV é um dos vírus mais disseminados desta família, levando à soropositividade mais de 80% da população humana. O AAV selvagem possui um genoma de apenas 4,7 Kb com seqüências terminais repetidas invertidas (ITRs) e se integra ao genoma em um sítio específico no cromossomo 19. Entretanto, a integração sítio-específica eficiente requer a presença da proteína viral Rep, que normalmente não é incluída nos vetores AAV, pois como todas as funções em *cis* necessárias para a produção do vetor estão localizadas na região ITR e 45 nucleotídeos imediatamente adjacentes, as duas fases abertas de leitura (ORFs – do inglês: *open reading frames*) do vírus, *Rep* e *Cap*, podem ser completamente substituídas pelo transgene de interesse e seu promotor. Vetores de até 5,2 Kb podem ser empacotados, entretanto o tamanho ótimo para o genoma do vetor AAV é entre 4,1 e 4,9 Kb. Os genes *Rep* e *Cap* são fornecidos em outro plasmídeo, o plasmídeo de empacotamento (Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001).

O proteoglicano heparan sulfato é o receptor primário do AAV tipo 2. A ligação do AAV ao heparan sulfato propicia a sua ligação à membrana celular, enquanto a

integrina  $\alpha\beta 5$  e/ou o receptor 1 do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR1) atuam como co-receptores para a infecção de AAV. Este último é necessário para a eficiência da ligação do AAV na superfície celular e para sua entrada na célula. Para que haja uma infecção produtiva, o AAV depende da co-infecção das células-alvo por um vírus auxiliar (adeno- ou herpes vírus). Na ausência deste, o AAV pode estabelecer uma infecção latente.

Existem pelo menos sete sorotipos de AAV conhecidos. Recentemente, foram descobertos outros sorotipos a partir de amostras de tecidos de mamíferos, e alguns deles estão sendo analisados quanto ao seu potencial uso como vetor. Diferentes sorotipos infectam tecidos com eficiência variada. O sorotipo mais comumente utilizado para produção de vetores é o AAV2, que infecta muito bem o cérebro e a retina, tendo sido utilizado em um amplo espectro de aplicações envolvendo esses órgãos. Já o AAV1 apresenta um tropismo maior pelo músculo. À medida que mais e mais sorotipos forem caracterizados, e os capsídeos de diferentes sorotipos puderem ser combinados para gerar novos tropismos, surgirá a possibilidade de que tecidos que não são facilmente infectados por AAV possam se tornar suscetíveis à transferência gênica baseada neste vetor. Atualmente, há vários ensaios clínicos avaliando o uso de vetores AAV, para doenças genéticas e adquiridas, em andamento (Pfeifer and Verma, 2001; Worgall, 2005).

Os vetores de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) são sistemas de “entrega” gênica promissores, baseados em vírus adeno-associado tipo 2 (AAV2), defectivo e não-patogênico (Xiao *et al.*, 1997). Todos os vetores são derivados de um plasmídeo que contém apenas 145 pb das repetições terminais invertidas (ITRs) do AAV, flanqueando o cassete com o transgene de escolha. As seqüências virais codificantes deletadas estão presentes em um plasmídeo separado, o plasmídeo auxiliar ou de empacotamento. A geração de rAAV requer a transfecção de ambos constructos em células infectadas com adenovírus (Ad) (Pfeifer and Verma, 2001). Como não há homologia entre o vetor e as seqüências auxiliares, os rAAVs produzidos neste sistema são essencialmente livres de AAV selvagem. A capacidade de gerar rAAV livre de tipo selvagem minimiza a possibilidade de expressão gênica viral indesejável, que causa reações imunes do hospedeiro, como observado com outros vetores. Aliado à sua capacidade de infectar células mitóticas e pós-mitóticas, estudos recentes *in vivo* têm resultado

em transferência gênica eficiente e persistente em vários tecidos, órgãos e sistemas, incluindo sistema nervoso central, retina, músculo, pulmão e fígado (revisto em Xiao and Samulski, 1998; Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001).

As regiões ITRs, que funcionam como origem de replicação do DNA, sinal de empacotamento e de integração, também atuam como elemento regulatório para a expressão gênica do AAV selvagem. Por isso, embora estejam envolvidas na expressão gênica do AAV selvagem, as seqüências ITRs são excluídas do plasmídeo auxiliar para evitar a geração de vírus selvagem recombinante. A região promotora p5 do AAV também funciona como um potencializador na regulação da expressão das proteínas p19 e p40, Rep52/42 e capsídeo (Cap). Assim, a expressão gênica do plasmídeo de empacotamento precisa ser otimizada para a expressão de Rep e Cap para que se obtenha replicação e empacotamento eficientes do vetor. A superexpressão das proteínas AAV Rep 78/68, pela substituição do promotor p5 por promotores heterólogos fortes, resulta em uma produção de rAAV consideravelmente mais baixa. Por outro lado, a redução da expressão de Rep 78/68, pela substituição do códon de iniciação ATG por ACG e adição de uma segunda cópia do promotor p5 3' do *Cap*, que inibe sua própria atividade transcricional, resulta em uma produção de rAAV muito maior (aproximadamente 15 vezes mais do que os plasmídeos de empacotamento convencionais). Isto sugere que a regulação apropriada da expressão gênica do AAV apresenta papel crucial na produção de rAAV, e que a manipulação do plasmídeo de empacotamento para otimizar a expressão gênica do AAV pode levar a uma melhora na produção do vetor. Além disso, o fornecimento adequado das funções auxiliares a partir de genes essenciais de Ad também é igualmente crítico, pois estes genes não só regulam a expressão de genes AAV, como também modificam o microambiente celular para permitir a propagação do AAV (Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001; Smith, 2003).

Como citado anteriormente, uma característica marcante do AAV é a necessidade de co-infecção com um vírus não relacionado, como o Ad, para fornecer funções auxiliares essenciais para um ciclo viral produtivo. Vários genes adenovirais, incluindo *E1a*, *E1b*, *E2a*, *E4* e *VA RNA*, possuem estas funções auxiliares. *E1a* serve como um transativador, super-regulando a atividade transcricional de vários genes de Ad, bem como dos genes *Rep* e *Cap* de AAV. O gene *E1b* interage com



*E4* podendo facilitar o transporte de RNAm viral no momento adequado. O gene *E4*, especialmente a ORF 6, também está envolvido na facilitação da replicação do DNA do AAV. Os genes *E2a* e *VA RNA* atuam aumentando a estabilidade e eficiência de tradução dos RNAm do AAV, especialmente para os transcritos do gene *Cap*. Para produzir rAAV, as funções auxiliares do Ad são geralmente fornecidas por infecção da partícula de Ad após co-transfecção dos plasmídeos de empacotamento e do vetor rAAV (Pfeifer and Verma, 2001).

Embora este procedimento para introduzir os genes auxiliares de Ad seja o mais eficiente, vários problemas surgem como resultado desta infecção. O primeiro deles é a necessidade de remover as partículas contaminantes de Ad. Além disso, a competição inerente entre AAV e Ad para funções de genes virais críticos afeta a produção final dos vetores gerados. A remoção completa de Ad está baseada em técnicas físicas que incluem gradientes de CsCl<sub>2</sub>, cromatografia, e uma etapa de desnaturação pelo calor para inativar qualquer partícula de Ad residual que ainda possa estar presente (Vincent *et al.*, 1997). Embora a maioria destes procedimentos tenha sido bem sucedida em algum grau, a potencial contaminação com Ad é um risco indesejado, e a presença de proteínas adenovirais desnaturadas é inaceitável para uso clínico. Por isso, a possibilidade de utilização de produção de rAAV na ausência de Ad, como descrito por Xiao and Samulski (1998), através da utilização de um plasmídeo rAAV, um plasmídeo de empacotamento (com *Rep* e *Cap*) e um plasmídeo auxiliar, contendo apenas os genes *E2a*, *E4* e *VA RNA* do Ad5, e a utilização da linhagem celular empacotadora 293 que contém o gene *E1*, constitui uma alternativa promissora para uma maior viabilização do uso de vetores AAV na terapia gênica.

### C. Retrovírus

Os sistemas virais baseados em retrovírus e lentivírus têm espaço suficiente para muitas aplicações (8 Kb), apresentam baixa imunogenicidade, e levam à expressão gênica persistente. Os vetores retrovirais foram os primeiros a serem utilizados em terapia gênica. Os retrovírus se integram ao genoma de células em divisão. Os principais alvos para os vetores retrovirais são as doenças genéticas de células T e doenças hematológicas. Até agora, a única correção significativa de uma doença genética usando TG foi através da transferência gênica mediada por retrovírus para células-tronco hematopoiéticas. Já os vetores lentivirais podem

infectar células proliferativas e células quiescentes, o que amplia o seu potencial de aplicação para células-alvo que não podem ser infectadas por retrovírus. Estudos em modelos animais mostraram sucesso na correção de doenças genéticas hematológicas e na transferência gênica para o cérebro e para o fígado. Os vetores lentivirais são os mais novos membros dos vetores de transferência gênica e, atualmente, há um ensaio clínico em andamento nos Estados Unidos utilizando vetores lentivirais em células hematopoiéticas de pacientes com HIV. Como para os vetores retrovirais, a mutagênese insercional é um risco em potencial. Recentemente, foi relatada uma tendência para integração de vetores retrovirais (vírus Moloney) próximo ou em genes transcricionalmente ativos, embora os sítios exatos de integração ainda não sejam bem conhecidos, e várias abordagens, como o uso de insuladores genéticos e elementos regulatórios célula-específicos, têm sido desenvolvidas para reduzir este risco (Pfeifer and Verma, 2001; revisado em Worgall, 2005).

#### D. Herpes Vírus (HSV)

Vetores derivados de HSV têm sido estudados, principalmente para terapia gênica de células neuronais. Estes vetores apresentam a maior capacidade para incorporação de transgene, se comparado com qualquer outro sistema viral. No entanto, seu uso *in vivo* tem sido limitado pela sua toxicidade e indução de resposta inflamatória (Pfeifer and Verma, 2001; Worgall, 2005).

### 2.1. TERAPIA GÊNICA PARA O TRATAMENTO DA MPSI

A aplicação de terapia gênica para MPS I apresenta-se como uma alternativa promissora. Em humanos, estudos iniciais mostraram a possibilidade de transfectar fibroblastos com o gene da IDUA (Anson *et al.*, 1992), e estudos posteriores *in vitro* indicaram também a possibilidade de transfectar células CD34<sup>+</sup> de medula óssea normal ou de pacientes com MPS I (Huang *et al.*, 1997). Entretanto, problemas com a manutenção da expressão do gene nas células transfectadas tornaram-se aparentes, justificando a exploração de protocolos pré-clínicos e clínicos com vetores virais.

Com a disponibilização de modelos murinos (Clarke *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2003) e caninos (Barsoum *et al.*, 2003) para MPS I, vários estudos pré-clínicos de

terapia gênica estão sendo realizados, com emprego de diferentes tipos de vetores. Hartung *et al.* (2004) obtiveram altos níveis de atividade de IDUA nos órgãos e plasma do modelo murino de MPS I tratado com vetores adeno-associados. Esses níveis enzimáticos elevados persistiram durante os cinco meses de estudo. Foi observada progressão em alguns parâmetros clínicos como diminuição nos estoques de GAGs nos órgãos avaliados, redução de GAGs excretados na urina, normalização do peso do animal e a melhora das características craniofaciais. No mesmo modelo murino, Desmaris *et al.* (2004) relataram atividade da IDUA no cérebro, quando os animais foram injetados com outros sorotipos de vetores adeno-associados como o sorotipo 2 (AAV2) e 5 (AAV5). Mais recentemente, em outro estudo de terapia gênica com camundongos neonatos do modelo murino de MPS I, a transferência do gene IDUA canino foi realizada através de um retrovírus derivado de Moloney. Os animais submetidos a esse tipo de tratamento apresentaram níveis enzimáticos de IDUA capazes de prevenir os efeitos da doença (Liu *et al.*, 2005b). Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (Camassola *et al.*, 2005), camundongos KO para o gene IDUA (fornecidos pela Dr. Elizabeth Neufeld, UCLA) foram tratados com um vetor não-viral contendo cDNA IDUA humano (pRIDUA), através de injeção endovenosa hidrodinâmica ou por injeção intraperitoneal de complexos pRIDUA/Superfect. A concentração de GAGs e atividade de IDUA foram avaliadas em vários órgãos, e a expressão de IDUA foi analisada por RT-PCR. Os resultados mostraram expressão do transgene em todos os órgãos nos animais tratados, e atividade enzimática em alguns dos órgãos (principalmente no baço, cérebro e pulmão), embora o nível de atividade tenha sido baixo, o que talvez possa ser otimizado com o uso de vetores virais.

A terapia gênica *ex vivo* também tem se mostrado como importante alternativa para vários tipos de patologias. Na MPS I, Zheng *et al.* (2003) desenvolveram um protocolo *ex vivo* no modelo murino usando um vetor baseado no vírus de sarcoma mieloproliferativo. Células de medula óssea foram eficientemente transduzidas, e após infusão nos animais migraram até o cérebro, onde a enzima foi expressa.

### 3. TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSCs – do inglês: *mesenchymal stem cells*) são células multipotentes que podem ser isoladas da medula óssea e que são capazes de se diferenciar em linhagens celulares provenientes de qualquer das três camadas germinativas, tais como: osteoblastos, condrócitos, células endoteliais, miócitos, fibroblastos, células tipo neuronais (Pereira *et al.*, 1995; Pittenger *et al.*, 1999; Baxter *et al.*, 2002; Kassem, 2004).

Baxter *et al.* (2002) mostraram que após transdução com vetor retroviral, células mesenquimais de pacientes com MPS I (Síndrome de Hurler) expressaram altos níveis de IDUA e secretaram níveis acima do normal de enzima para o meio extracelular, levando à normalização do nível de GAGs nas células MPS I. Além disso, as MSCs geneticamente modificadas foram capazes de corrigir a deficiência enzimática de fibroblastos MPS I não transduzidos.

Em conjunto, estes resultados indicam que as MSCs podem ser um alvo melhor do que as células-tronco hematopoiéticas para terapia gênica de doenças multissistêmicas de acúmulo lisossomal, inclusive as mucopolissacaridoses (Peters *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1997; Kopen *et al.*, 1999; Baxter *et al.*, 2002).

Há vários métodos disponíveis para o isolamento de MSCs baseados nas suas características físicas e físico-químicas, como a aderência a superfícies plásticas ou outros componentes da matriz extracelular. Com isso, vários grupos têm conseguido isolar linhagens de MSCs, dando a cada uma delas um nome específico: MPC (Reyes *et al.*, 2001), MAPC (Jiang *et al.*, 2002), MIAMI (D'ippolito *et al.*, 2004). A cada dia novas linhagens vão sendo isoladas por diferentes métodos e a partir de diferentes órgãos (De Bari *et al.*, 2001; Kuznetsov *et al.*, 2001; Lodie *et al.*, 2002; Meirelles and Nardi, 2003; Miura *et al.*, 2003; Rosada *et al.*, 2003; Lakshmipathy and Verfaillie, 2005). Comparações entre essas linhagens ainda não foram bem estabelecidas (Ratajczak *et al.*, 2004; Kucia *et al.*, 2005), mas serão fundamentais para se determinar as semelhanças e diferenças entre cada uma delas (Nardi, 2005).

Devido à sua plasticidade e facilidade de isolamento, as MSCs estão entre os primeiros tipos de células-tronco, depois das hematopoiéticas, introduzidos na clínica. Vários estudos têm demonstrado a possibilidade do uso de MSCs no

transplante sistêmico para casos de doenças sistêmicas, implante local para defeitos teciduais locais, como veículo para distribuição de genes exógenos em protocolos de terapia gênica, ou para gerar tecidos e órgãos transplantáveis em protocolos de engenharia de tecidos. No entanto, antes do amplo uso de MSCs em terapia, métodos que permitam a geração de um grande número de células sem afetar seu potencial de diferenciação (plasticidade), bem como tecnologias que superem o problema da rejeição imunológica (nos casos de transplante alogênico) precisam ser desenvolvidos (Kassem, 2004).

### Caracterização das MSCs

Morfologicamente, as MSCs são, em sua maioria, células fusiformes e cuboidais, tipo fibroblastos. Essas células são negativas para marcadores de superfície de células hematopoiéticas: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 e positivas para CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 e CD44 (Pittenger *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2001; Meirelles and Nardi, 2003; D'ippolito *et al.*, 2004). No entanto, ainda não há uma caracterização consensual de marcadores de superfície para essas células. A característica mais importante das MSCs é a sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares *in vitro*, dependendo das condições de cultura (osteoblastos [Kassem *et al.*, 1993; Meirelles and Nardi, 2003], adipócitos [Justesen *et al.*, 2002; Meirelles and Nardi, 2003], condrócitos [Johnstone *et al.*, 1998], células tipo neuronais e células tipo endodérmicas [Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; D'ippolito *et al.*, 2004]).

### Aplicações de MSCs em terapia

As MSCs, que são de fácil obtenção e proliferação, são candidatas ideais para o uso em protocolos de medicina regenerativa, caracterizada pelo transplante de células e órgãos e que constitui uma área promissora para o tratamento de uma variedade de doenças que ainda não possuem tratamento específico ou eficaz, como as doenças degenerativas e algumas doenças multissistêmicas como a mucopolissacaridose. Quatro principais metodologias têm sido investigadas quanto ao seu potencial clínico: administração local de MSCs para doenças localizadas, transplante sistêmico, uso combinado de terapia celular e terapia gênica e uso de MSC em protocolos de bio-engenharia de tecidos (Kassem, 2004).

### Administração local de MSCs

Vários estudos com modelos animais têm demonstrado a eficácia da administração local de MSCs para o tratamento de doenças localizadas, como defeitos ósseos (Bruder *et al.*, 1994; Ohgushi *et al.*, 1989; Quarto *et al.*, 2001), defeitos de cartilagem (Diduch *et al.*, 2000), isquemia vascular devido à doença arterial periférica (Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002), doença da artéria coronária (Assmus *et al.*, 2002; Wollert *et al.*, 2004) e feridas de pele crônicas não-cicatrizantes (Badiavas *et al.*, 2003). Nestes estudos, as células injetadas foram bem toleradas e se observaram bons resultados. Entretanto, estes resultados precisam ser confirmados em outros ensaios pré-clínicos e em ensaios clínicos randomizados com número adequado de pacientes (Kassem, 2004).

### Transplante sistêmico de MSCs

Durante um longo período, o transplante sistêmico de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) foi utilizado para o tratamento de diversas doenças hematológicas. Atualmente, alguns investigadores têm avaliado protocolos similares com MSCs. Entretanto, um dos desafios é melhorar a eficiência do enxerto das MSCs na medula óssea e no osso (Gao *et al.*, 2001). Alguns estudos bem-sucedidos têm sido realizados com doenças como a osteogênese imperfeita (Horwitz *et al.*, 2002), MPS I (Síndrome de Hurler) (Koc *et al.*, 2002) e anemia aplástica idiopática (Fouillard *et al.*, 2003).

### Terapia celular combinada à terapia gênica

A modificação genética de células-tronco é uma abordagem atraente para a terapia gênica, devido à alta capacidade proliferativa destas células e a sua sobrevivência prolongada, quando comparada com outras células somáticas (Kassem, 2004). Sendo assim, é possível a substituição de genes defectivos em doenças humanas através da modificação genética de células-tronco do próprio paciente *ex vivo*, seguida de re-introdução destas células no paciente (Stanworth and Newland, 2001). As MSCs têm demonstrado ser capazes de expressar proteínas exógenas (factor VIII e IL-3, por exemplo) por longos períodos de tempo e de manter esta capacidade após transferência *in vitro* (Allay *et al.*, 1997).

A terapia gênica tem sido investigada para o tratamento de várias doenças genéticas monogênicas, câncer e, até mesmo, doenças infecciosas. Em todas

essas abordagens, a possibilidade do uso de células-tronco como vetor pode ser promissora (Stanworth and Newland, 2001).

Em um estudo preliminar, Shull *et al.* (1994) demonstraram que a terapia de reposição enzimática não era eficiente para sanar a deficiência de IDUA em tecidos-chave como cérebro, cartilagem e válvulas cardíacas no modelo canino de MPS I. Isso reflete a necessidade do desenvolvimento de terapias capazes de corrigir a doença também no SNC. Neste contexto, o grupo de Neufeld (Zheng *et al.*, 2003) demonstrou, em seu modelo murino de MPS I, que animais com genótipo IDUA - / - que receberam medula de animais normais tinham níveis de alfa-L-iduronidase abaixo do normal, mas suficientes para reduzir o acúmulo de GAGs, enquanto a quantidade de enzima detectada era mínima nos rins e nenhuma no cérebro. Entretanto, quando a medula óssea era transduzida com um vetor retroviral carregando o gene IDUA, não apenas o fígado e o baço dos receptores apresentavam níveis de alfa-L-iduronidase várias vezes acima do normal, como também o rim. Neste último caso, o nível de enzima no cérebro foi normalizado em 2 de 3 camundongos (Zheng *et al.*, 2003). Considerando-se assim as características das MSCs e as evidências de que elas são capazes de migrar para o cérebro, o modelo murino de MPS I pode ser utilizado para o desenvolvimento de uma terapia celular da MPS I em humanos.

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu metodologia para o isolamento e cultivo de MSCs murinas, mostrando que as células isoladas de camundongos nocaute para o gene IDUA (IDUA - / -) apresentam a mesma plasticidade e condições de expansão que as derivadas de animais normais (Meirelles and Nardi, 2003). Estas células mostraram-se também apropriadas para a função de linhagem empacotadora para um vetor baseado em HIV com o gene da beta-galactosidase (Silva *et al.*, comunicação pessoal). As linhagens de MSCs apresentam-se assim como alvo potencial para os procedimentos de terapia gênica *ex vivo*.

Este trabalho foi dividido em duas partes: a análise da biodistribuição das MSCs, a partir de diferentes vias de administração em camundongos C57BL/6 normais (artigo 1); e o tratamento do modelo murino de MPSI com MSCs provenientes de camundongos isogênicos administradas pela via mais adequada segundo a primeira parte do trabalho. No entanto, aqui será apresentada apenas a primeira

parte, a análise de biodistribuição, já que a segunda parte ainda apresenta análises laboratoriais em andamento.



**I. THE STATE OF THE ART OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS-  
BASED VECTORS IN GENE THERAPY**

***VIROLOGY JOURNAL, 4:99-105 (2007)***

## The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy

Renata dos Santos Coura and Nance Beyer Nardi\*

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

Email: Renata dos Santos Coura - [rsoura@yahoo.com](mailto:rsoura@yahoo.com); Nance Beyer Nardi\* - [nardi@ufrgs.br](mailto:nardi@ufrgs.br)

\* Corresponding author

Published: 16 October 2007

Received: 29 August 2007

*Virology Journal* 2007, 4:99 doi:10.1186/1743-422X-4-99

Accepted: 16 October 2007

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/4/1/99>

© 2007 Coura and Nardi; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

The adeno-associated virus (AAV) has rapidly gained popularity in gene therapy since the establishment of the first AAV2 infectious clone, in 1982, due to some of their distinguishing characteristics such as lack of pathogenicity, wide range of infectivity, and ability to establish long-term transgene expression. Notably over the past decade, this virus has attracted considerable interest as a gene therapy vector, and about 85% of the currently available 1,041 PubMed references on adeno-associated viruses have been published during this time. The exponential progress of AAV-based vectors has been made possible by the advances in the knowledge of the virology and biology of this virus, which allows great improvement in AAV vectors construction and a better comprehension of their operation. Moreover, with the recent discovery of novel AAV serotypes, there is virtually one preferred serotype for nearly every organ or tissue to target. Thus, AAV-based vectors have been successfully overcoming the main gene therapy challenges such as transgene maintenance, safety and host immune response, and meeting the desirable vector system features of high level of safety combined with clinical efficacy and versatility in terms of potential applications. Consequently, AAV is increasingly becoming the vector of choice for a wide range of gene therapy approaches. This report will highlight the state of the art of AAV-based vectors studies and the advances on the use of AAV vectors for several gene therapy approaches.

### Background

The adeno-associated virus (AAV) is a small, icosahedral and nonenveloped virus that belongs to the parvovirus family, specifically the Dependovirus genus. The members of this genus require a helper virus, such as adenovirus or herpes simplex virus, to facilitate productive infection and replication. In the absence of a helper virus, AAVs establish a latent infection within the cell, either by site-specific integration into the host genome or by persisting in episomal forms. The wild AAV capsid has approximately 22 nm and encapsidates a linear single-stranded DNA genome of about 4.7 kb of either plus or

minus polarity [1,2]. The AAV2 DNA termini consists of a 145 nucleotide-long inverted terminal repeat (ITR) that forms a characteristic T-shaped hairpin structure, due to the multipalindromic nature of its terminal 125 bases, which allows its fold on itself via complementary base pairing [3], forming a secondary structure that provides a free 3' hydroxyl group for the initiation of viral DNA replication [4]. This viral replication process relies on host cell polymerase activities, since AAV does not encode its own polymerase [5]. These ITRs are the only cis-acting elements required for genome replication and packaging, and flank the two large open reading frames (ORFs) of the

virus genome. The left ORF, Rep (replication), encodes four replication proteins (Rep 78, Rep 68, Rep 52, and Rep 48), through the use of two different promoters and alternative splicing, responsible for site-specific integration, nicking, and helicase activity, as well as regulation of promoters within the AAV genome. The right ORF, Cap (capsid), encodes, through alternative mRNA splicing and alternative start codon usage, the three viral structural proteins (VP1, VP2 and VP3) that assemble at a ratio of approximately 1:1:10, respectively, to form a mature AAV particle [6].

Following the establishment of the first infectious clone of AAV serotype 2 (AAV2) in 1982 [7] and the pioneering work on the successful cloning of AAV establishing the foundation of recombinant AAV vectors capable of expressing foreign genes in mammalian cells [8,9], in the early 1980s, AAV2 vectors have rapidly gained popularity in gene therapy applications, due to some of their distinguishing biological features. The unique life cycle of AAV demonstrates how this class of viruses has adapted to coexist with mammalian hosts in a manner that allows for long-term persistence without any detectable deleterious effect on the host. Despite the deceptively simple structure of AAV, this virus is able to use its nonstructural proteins to facilitate replication as a satellite of other DNA viruses during its productive phase, as well as to establish stable integrated and episomal forms during its latent phase [4,10,11]. This requires numerous complex interactions between AAV genomic elements, AAV proteins, host proteins, and helper virus proteins [12]. Many of those mechanisms have been elucidated in detail for the AAV2, the best characterized AAV serotype [13,14]. Therefore, the nonpathogenic and persistent long-term nature of AAV infection combined with its wide range of infectivity have made this virus an important candidate as a therapeutic gene transfer vector.

Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors have rapidly advanced to the forefront of gene therapy in the past decade. The exponential progress of AAV-based vectors has been made possible by the advances in the knowledge of the virology and biology of this virus, which allows great improvement in AAV vectors construction and a better comprehension of AAV vectors operation. Moreover, with the recent discovery of novel AAV serotypes, there is virtually now one preferred serotype for nearly every organ or tissue to target, since these isolates are ideally suited to development into human gene therapy vectors due to their diverse tissue tropisms and potential to evade preexisting neutralizing antibodies against the common human AAV serotype 2. Thus, rAAV-based vectors have been successfully overcoming the main gene therapy challenges and meeting the desirable vector system features of high level of safety combined with clinical

efficacy and versatility in terms of potential applications. Consequently, rAAV are increasingly becoming the vector of choice for a wide range of gene therapy approaches.

This review will originally highlight the state of the art of AAV-based vector studies and the advances in the use of AAV vectors in several gene therapy approaches.

#### **Characteristics of AAV-based vectors**

As mentioned above, in the early 1980s, pioneering work on the successful cloning of AAV established the foundation of recombinant AAV vectors capable of expressing foreign genes in mammalian cells. Since then, the AAV has been more and more studied and considered for gene therapy applications. In all, 85% of the available (up to June 2007) 2,041 PubMed references on AAV were published during the last 10 years.

This increasing interest on AAV is justified by its characteristic features that distinguish it from many other viral vector systems, such as retro/lentiviral and adenoviral vectors, and turn it into a very attractive tool for gene therapy. These features, as mentioned above, include: (1) its nonpathogenicity and nonimmunogenicity as well as its heat stability and resistance to solvents and to changes in pH and temperature [15]; (2) AAV vectors only retain about 300 nucleotides of viral sequence in the form of nontranscribed ITRs, which greatly improves its safety for human clinical applications by reducing the risk of recombination with wild-type viruses. Moreover, lack of viral coding sequences extends the duration of gene expression as no viral gene products are expressed in target cells, which reduces the risk of eliciting a cellular immune response; (3) AAV vectors have a broad host and cell type tropism range and transduce both dividing and nondividing cells in vitro and in vivo. Furthermore, the recent discovery of novel AAV serotypes will expand even more the universe of potential target organs, tissues and cells; and (4) AAV vectors maintain (over several years) high levels of gene expression in vivo, in the absence of a significant immune response to the transgene product. This is a major requirement for gene therapy approaches for some diseases, and constitutes the most promising and distinguishing features of AAV vectors.

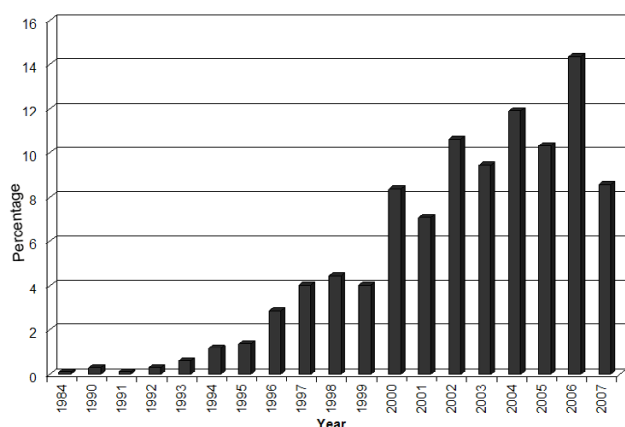
However, there are also a few drawbacks in using AAV vectors for gene therapy applications. (1) Their size limits the insertion of gene expression cassettes. Whereas strategies have been developed to overcome this limitation, those approaches still suffer from low efficiency resulting in decreased levels of gene expression. (2) Gene expression is generally of slow onset, due to the requirement of conversion of the single-stranded AAV DNA into double-stranded DNA before gene expression can be initiated. Strategies developed to overcome this limitation include

the construction of double-stranded DNA vectors, but this results in further reduction in the size capacity of transgene insertion, as one has to incorporate the gene twice into the vector (in its sense and antisense orientation). (3) A possible association between AAV2 vector gene transfer and tumorigenesis has been suggested, in a preclinical study with an animal model for mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) [16]. To date, these results have not yet been reproduced and the cause for the malignancies is still unclear. And (4), some investigators have shown preferential integration of recombinant AAV2 vectors into transcriptionally active chromatin regions [17,18]. Nevertheless, the overall frequency of rAAV2 integration is very low and it is not clear yet whether this is a general phenomenon or specific for liver or the model used or AAV2.

#### The state of the art of AAV-based vectors in gene therapy

Despite existing limitations and troubles to be resolved and overcome, rAAV-based gene transfer vectors still represent one of the most promising gene therapy systems and gain increasing popularity. In a search for "AAV gene therapy", 1,016 PubMed references were recovered (until June 2007). The first paper, on the use of AAV as mammalian DNA cloning vector, was published in 1984 by Hermonat and Muzyczka [9]. Since then, a rapidly growing number of studies on AAV-based vectors have been published, as shown in Figure 1.

The initial studies described aspects of the virology and molecular biology of the virus, virus isolation, as well as methods for gene transfer and expression in *in vitro* studies. As this vector system was used with increasing in gene delivery protocols, the interest in the complexities of AAV biology and transduction ability has also raised, and a



**Figure 1**  
Percentage of published papers on AAV gene therapy, according to PubMed search (until June 2007).

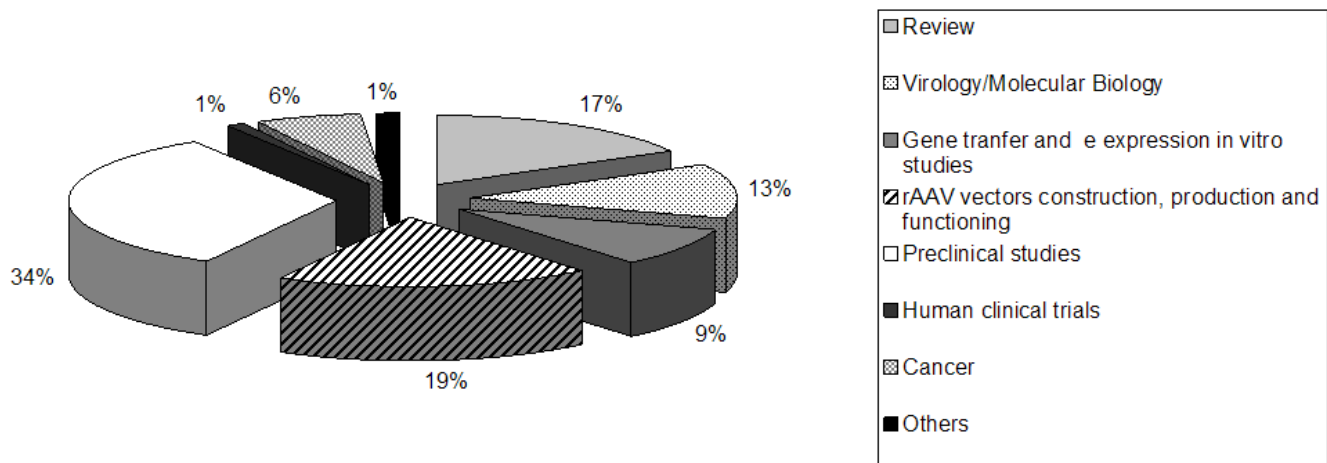
considerable diverse potential for different cell types and target tissues was described [19]. Simultaneously, research efforts concentrated on rAAV construction, production and purification, as well as on the understanding and improvement of their functioning.

Publications on the use of AAV-based vectors in gene therapy may be classified into ten large groups (Figure 2): (1) review; (2) virology and molecular biology; (3) gene transfer and expression studies *in vitro*; (4) construction, production and functioning of rAAV vectors; (5) preclinical studies; (6) human clinical trials; (7) preclinical and clinical *ex-vivo* approaches; (8) cancer; (9) vector biodistribution and routes of vector administration; (10) association of cellular and gene therapy. As presented in Figure 3, the great majority of papers concerns to preclinical studies, followed by studies on the construction, production and functioning of rAAV vectors. Human clinical trials are just beginning to appear in this scenario.

If each area is analyzed along the time, we can observe that studies concerning AAV virology and molecular biology are relatively constant, which is to be expected since basic research is of crucial importance to provide the information needed for pre-clinical and clinical studies. *In vitro* studies have been decreasing in number, to the advantage of *in vivo* and preclinical studies which have had their peak in the least year. Pre-clinical studies and clinical trials using AAV-based vectors will be detailed below.

The analysis of publications available in the PubMed show that several animals have been used in preclinical studies investigating the use of AAV-based. The mouse is the most frequently used animal, corresponding to about 68% of preclinical studies. The second most frequent animal model is the rat, used in 19% of the studies. Primate and canine models are used in 10% and 13% of *in vivo* animal studies, respectively. Other less expressive models are the guinea pig, rabbits, hamster (5% each one) and gerbil (only one study).

Recombinant AAV2 vectors have been tested in preclinical studies for a variety of diseases such as hemophilia,  $\alpha$ 1-anti-trypsin deficiency, cystic fibrosis, Duchenne muscular dystrophy, rheumatoid arthritis and others. Figure 2 presents the type and frequency of target diseases for which AAV-based vectors gene therapy is under study. Genetic diseases is the leading group of target diseases (32%), followed by tumors (19%), neurological disorders (14%), ocular (11%) and cardiovascular (10%) diseases, chronic disorders (5%) and others (9%). For all of them, the majority of papers concerns to both preclinical and clinical *in vivo* studies, although clinical trials are still scarce. In a review published in 2004 about the use of AAV



**Figure 2**  
Publications on AAV-based gene therapy per area.

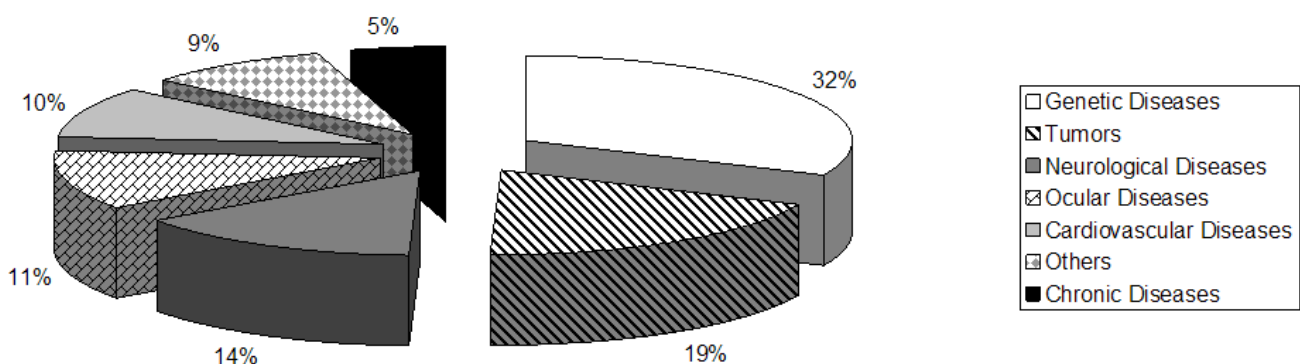
vectors for the treatment of inherited disorders [19], hemophilia was shown as the major target disease, corresponding to about 37% of the published papers. Muscular dystrophy, cystic fibrosis and lysosomal storage disorders contributed with 20%, 18% and 20% of all reports, respectively. Other genetic diseases are still poorly investigated regarding AAV-based gene therapy approaches.

In our PubMed research, we found 15 publications describing the results of clinical trials. Among them, 13 are phase I trials and two are phase II studies. Currently, several clinical trials evaluate the use of AAV vectors for genetic and acquired diseases [20-22]. From 1989 until now, a total of 1,283 gene therapy clinical trials have been approved. Only 4% (47) of them are AAV-based gene therapy trials, distributed in phase I (66%), phase I/II (17%), phase II (6%) and phase III (11%). The first trial

was approved in 1994, but most of the trials were approved in 2004, 2005 and 2006 [22]. Table 1 shows the number of clinical trials with AAV-based vectors and their status in June 2007.

Despite the fact that the main target disease for gene therapy clinical trial is cancer (67%), followed by cardiovascular disease (9.1%) and monogenic diseases (8.4%), AAV-based gene therapy trials are mainly focused on monogenic diseases (53%), followed by cancer that corresponds to 23% [22].

The first clinical trial results were published in 1999, with the treatment of cystic fibrosis patients with an AAV-based vector [23]. Currently, this is the disease most frequently treated with AAV vectors [24-26], followed by hemophilia B [27,28]. There are also phase I human trials for  $\alpha$ 1-anti-



**Figure 3**  
Target diseases for AAV gene therapy approaches.

**Table 1: Clinical trials with AAV-based vectors [22].**

Category/Disease	Clinical trial				
	Phase I O/C*	Phase I/II O/C	Phase II O/C	Phase III O/C	Total
<b>Infectious</b>					
HIV vaccine	2/0	0/0	0/0	0/0	2
<b>Cancer</b>					
Malignant melanoma	1/0	0/0	0/0	0/0	1
Prostate cancer	0/1	2/1	0/0	4/0	8
Hormone refractory prostate cancer	1/0	0/0	0/0	0/0	1
Metastatic prostate cancer	0/0	0/0	0/0	1/0	1
<b>Genetic</b>					
Lipoprotein lipase deficiency	0/0	1/0	0/0	0/0	1
Haemophilia B	1/2	0/0	0/0	0/0	3
Early onset retinal degeneration	3/0	0/0	0/0	0/0	3
Cystic fibrosis	2/3	1/1	0/2	0/0	9
Muscular dystrophy	1/0	0/0	0/0	0/0	1
Canavan disease	1/0	0/0	0/0	0/0	1
Duchenne muscular dystrophy	1/1	0/0	0/0	0/0	2
Limb Girdle muscular dystrophy	1/0	0/0	0/0	0/0	1
Amyotrophic lateral sclerosis	1**/0	0/0	0/0	0/0	1
Inherited autosomal recessive alpha-1-antitrypsin deficiency	2/0	0/0	0/0	0/0	2
Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis	1/0	0/0	0/0	0/0	1
<b>Neurological</b>					
Parkinson's disease	1/1	0/0	1/0	0/0	3
Alzheimer's disease	0/0	0/1	0/0	0/0	1
Epilepsy	1/0	0/0	0/0	0/0	1
<b>Cardiovascular</b>					
Heart failure	2/0	0/0		0/0	2
<b>Others</b>					
Rheumatoid arthritis	2/0	0/0	0/0	0/0	2
<b>TOTAL</b>	<b>24/8</b>	<b>4/3</b>	<b>1/2</b>	<b>5/0</b>	<b>47</b>

\* O/C, open/closed; \*\* under review.

trypsin deficiency [29], Canavan disease [30-32], infantile neuronal ceroid lipofuscinosis [33] and Parkinson disease [34]. The only two phase II clinical trials already published were directed to cystic fibrosis [35,36]. At least 20 clinical trials have been completed or initiated with 15 different AAV2-based vectors being administered in several hundred patients [37].

### Results and perspectives

The studies so far have shown that AAV-based vectors, and particularly the AAV2 serotype, are in general safe and efficient tools for gene transfer, but have also pointed out that transduction efficiency of AAV2 vectors falls short of requirements for adequate and organ-specific transgene expression. As a result, research efforts focused on modifying both vector genomes and capsid proteins to improve

the transduction efficiency and/or specificity of AAV2-based vectors have been emerging. Self-complementary AAV2 vectors [38-40], for instance, were developed to bypass rate-limiting second-strand DNA synthesis and display enhanced transduction in comparison with conventional AAV vectors in some organs and tissues as liver [38-40], muscle [40], brain [41], retina [42] and cancer cells [43]. Other efforts have focused on manipulating the AAV2 capsid through site-directed and insertional mutagenesis, peptide display libraries, and chemical conjugation [44,45].

The repertoire of rAAV vectors has been greatly expanded by the development of technologies to pseudo-package rAAV genomes, package AAV genomes with two different ITR serotypes, generate mosaic rAAV particles with more

than one capsid serotype, retarget AAV by generating rAAV capsid modification and generate rAAV with chemically modified capsids. These technologies have greatly expanded the ability to fit rAAV for specific gene therapy applications [46,47].

These publications reveal also a great interest on rAAV biology, concerning particularly virus intracellular trafficking which has been shown a major rate-limiting step in rAAV transduction for many cell types. Moreover, it has also been indicated as critically affecting host immunological response toward input capsids in the absence of new viral protein synthesis. If so, altering the rate of intracellular trafficking and uncoating of rAAVs by the use of specific drugs or serotype modifications could directly influence the stability of gene expression, by reducing host immune responses that promote the clearance of virus-infected cells. Advances in understanding rAAV biology will lead to the improvement of the efficacy of this vector system for the treatment of inherited and acquired diseases.

## Conclusion

Progress in gene therapy is indisputable but has been slow and there have been many ups and downs. The two major hurdles to gene therapy, safety and efficacy, remain roadblocks to the widespread application of gene therapy as a standard medical treatment for disease. Improvement of efficacy can be mediated in part by the development of more efficient vectors. Retrovirus-based vectors represented the first attempt to use viral vectors, and were considered the great promise for gene therapy approaches. However, after the serious adverse events occurred with the Moloney virus, retrovirus had their potential questioned. Later, the development of lentiviral-based vectors renewed gene therapy expectations. Currently, although these vectors have been shown in preclinical studies to mediate high levels of stable gene transfer for long-term expression, there is reasonable concern regarding important safety aspects, in particular regarding recombination of a lentiviral vector into a replication-competent lentivirus (RCL) that might represent a novel and unpredictable pathogen; and insertional oncogenesis mediated by the "random" insertion of retroviruses into cellular DNA [48]. Presently, other virus vectors have been gaining an important place in gene therapy approaches, especially adenovirus and adeno-associated virus.

Since the adeno-associated virus was first isolated and its biological properties established, it has been considered a promising vector for gene therapy. Research approaches are disclosing advantages of this tools. Some obstacles have already been overcome, others are rising and need to be surpassed, and research advances will certainly bring more challenges for the near future. Nevertheless, AAV-

based vectors seem to bypass the main gene therapy barriers, such as long-term and stable transgene expression in many tissues, safety, broad range of target diseases and lack of immunogenicity and pathogenicity.

## Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

RSC was mainly involved with the PubMed research. RSC and NBN contributed equally to the writing of the manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through the program Instituto do Milênio – Rede de Terapia Gênica.

## References

1. Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP: **Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses.** *J Natl Cancer Inst* 1968, **40**:319-327.
2. Berns KI, Giraud C: **Biology of adeno-associated virus.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, **218**:1-23.
3. Koczo FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA: **Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, **70**:215-219.
4. Berns K: **Parvovirus replication.** *Microbiol Rev* 1990, **54**:316-329.
5. Ni T-H, McDonald WF, Zolotukhin I, Melendy T, Waga S, Stillman B, Muzyczka N: **Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection.** *J Virol* 1998, **72**:2777-2787.
6. Linden RM, Berns KI: **Biology of adeno-associated viruses.** *Contrib Microbiol* 1990, **68**:84.
7. Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N: **Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, **79**:2077-2081.
8. Laughlin CA, Tratschin JD, Coon H, Carter BJ: **Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids.** *Gene* 1983, **23**:65-73.
9. Hermonat PL, Muzyczka N: **Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue cultured cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, **81**:6466-6470.
10. Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF, Hoggan MD: **Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells.** *Virology* 1975, **68**:556-560.
11. Berns KI, Linden RM: **The cryptic life style of adeno-associated virus.** *Bioessays* 1995, **17**:237-245.
12. Muzyczka N, Samulski RJ, Hermonat P, Srivastava A, Berns KI: **The genetics of adeno-associated virus.** *Adv Exp Med Biol* 1984, **179**:151-161.
13. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM: **Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:11854-1189.
14. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM: **Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues.** *J Virol* 2004, **78**:6381-6388.
15. Wright JF, Qu G, Tang C, Sommer JM: **Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector.** *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003, **6**:174-178.
16. Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T, Sands MS: **Observed incidence of**

- tumorigenesis in longterm rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001, **8**:1343-1346.
17. Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA: **AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice.** *Nat Genet* 2003, **34**:297-302.
  18. Russell DW: **AAV loves an active genome.** *Nat Genet* 2003, **34**:241-242.
  19. Hildinger M, Auricchio A: **Advances in AAV-mediated gene transfer for the treatment of inherited disorders.** *Eur J Hum Genet* 2004, **12**:263-271.
  20. Pfeifer A, Verma IM: **Gene therapy: promises and problems.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001, **2**:177-211.
  21. Worgall S: **A realistic chance for gene therapy in the near future.** *Pediatr Nephrol* 2005, **20**:118-124.
  22. **Clinical trial database** [<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>]
  23. Wagner JA, Messner AH, Moran ML, Daifuku R, Kouyama K, Desch JK, Manley S, Norbash AM, Conrad CK, Friborg S, Reynolds T, Guggino WB, Moss RB, Carter BJ, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P: **Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus.** *Laryngoscope* 1999, **109**:266-274.
  24. Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH, Moran ML, Batson EP, Dimiceli S, Brown BV, Desch JK, Norbash AM, Conrad CK, Guggino WB, Flotte TR, Wine JJ, Carter BJ, Reynolds TC, Moss RB, Gardner P: **A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies.** *Hum Gene Ther* 2002, **13**:1349-1359.
  25. Aitken ML, Moss RB, Waltz DA, Dovey ME, Tonelli MR, McNamara SC, Ginson RL, Ramsey BV, Carter BJ, Reynolds TC: **A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease.** *Hum Gene Ther* 2001, **12**(15):1907-1916.
  26. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE: **Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial.** *Chest* 2004, **125**:509-521.
  27. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AV, High KA: **Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector.** *Nat Genet* 2000, **24**:257-261.
  28. Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, Liu T, Nagy D, Vargas JA, Zhou S, Scallan CD, Sommer J, Vijay S, Mingozzi F, High KA, Pierce GF: **Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy.** *Blood* 2006, **108**:3321-3328.
  29. Flotte TR, Brantly ML, Spencer LT, Byrne BJ, Spencer CT, Baker DJ, Humphries M: **Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults.** *Hum Gene Ther* 2004, **15**:93-128.
  30. Leone P, Janson CG, Bilaniuk L, Wang Z, Sorgi F, Huang L, Matalon R, Kaul R, Zeng Z, Freese A, McPhee SV, Mee E, During MJ: **Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease.** *Ann Neurol* 2000, **48**:27-38.
  31. Janson C, McPhee S, Bilaniuk L, Haselgrove J, Testaiuti M, Freese A, Wang DJ, Shera D, Hurh P, Rupin J, Saslow E, Goldfarb O, Goldberg M, Larijani G, Sharrar VV, Liouterman L, Camp A, Kolodny E, Samulski J, Leone P: **Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain.** *Hum Gene Ther* 2002, **13**:1391-1412.
  32. McPhee SV, Janson CG, Li C, Samulski RJ, Camp AS, Francis J, Shera D, Lioutermann L, Feely M, Freese A, Leone P: **Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease.** *J Gene Med* 2006, **8**:577-588.
  33. Crystal RG, Sondhi D, Hackett NR, Kaminsky SM, Worgall S, Stieg P, Souweidane M, Hosain S, Heier L, Ballon D, Dinner M, Wisniewski K, Kaplitt M, Greenwald BM, Howell JD, Strybing K, Dyke J, Voss H: **Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis.** *Hum Gene Ther* 2004, **15**:1131-1154.
  34. During MJ, Kaplitt MG, Stern MB, Eidelberg D: **Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation.** *Hum Gene Ther* 2001, **12**:1589-1591.
  35. Wagner JA, Nepomuceno IB, Shah N, Messner AH, Moran ML, Norbash AM, Moss RB, Wine JJ, Gardner P: **Maxillary sinusitis as a surrogate model for CF gene therapy clinical trials in patients with antrostomies.** *J Gene Med* 1999, **1**:13-21.
  36. Croteau GA, Martin DB, Camp J, Yost M, Conrad C, Zeitlin PL, Heald AE: **Evaluation of exposure and health care worker response to nebulized administration of tgAAVCF to patients with cystic fibrosis.** *Ann Occup Hyg* 2004, **48**:673-681.
  37. Carter BJ: **Adeno-associated virus vectors in clinical trials.** *Hum Gene Ther* 2005, **16**:541-550.
  38. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ: **Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis.** *Gene Ther* 2001, **8**:1248-1254.
  39. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ: **Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo.** *Gene Ther* 2003, **10**:2112-2118.
  40. Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J, Xiao X: **Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo.** *Gene Ther* 2003, **10**:2105-2111.
  41. Fu H, Muenzer J, Samulski RJ, Breese G, Sifford J, Zeng X, McCarty DM: **Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain.** *Mol Ther* 2003, **8**:911-917.
  42. Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL: **Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size.** *J Virol* 2002, **76**:7651-7660.
  43. Xu D, McCarty D, Fernandes A, Fisher M, Samulski RJ, Juliano RL: **Delivery of MDRI small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector.** *Mol Ther* 2005, **11**:523-530.
  44. Choi VV, McCarty DM, Samulski RJ: **AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery.** *Curr Gene Ther* 2005, **5**:299-310.
  45. Muzyczka N, Warrington KH Jr: **Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism.** *Hum Gene Ther* 2005, **16**:408-416.
  46. Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, Symons NA, Blits B, Niclou S, Boer GJ, Verhaagen J: **Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors.** *Mol Cell Neurosci* 2002, **21**:141-157.
  47. Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, Petrus I, Wang L, Ma L, DE Waele L, Iwasaki Y, Gillijns V, Wilson JM, Collen D, Chuah MK: **Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy.** *J Thromb Haemost* 2007, **5**:16-24.
  48. Manilla P, Rebello T, Afable C, Lu X, Slepushkin V, Humeau LM, Schonely K, Ni Y, Binder GK, Levine BL, MacGregor RR, June CH, Dropulic B: **Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector.** *Hum Gene Ther* 2005, **16**:17-25.



## **II. A ROLE FOR ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS IN GENE THERAPY**

***GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, 31 (1): 1-11 (2008)***



## A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy

Renata dos Santos Coura and Nance Beyer Nardi

*Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

### Abstract

Gene therapy constitutes a therapeutic intervention based on modification of the genetic material of living cells, by correcting genetic defects or overexpressing therapeutic proteins. The success of gene therapy protocols depends on the availability of therapeutically suitable genes, appropriate gene delivery systems and proof of safety and efficacy. Recent advances on the development of gene delivery systems, particularly on viral vectors engineering and improved gene regulatory systems, have led to marked progress in this field. Although the available vector systems can successfully transfer genes into cells, the ideal delivery vehicle has not been found. In this context, adeno-associated virus vectors (AAV) are arising as a promising tool for a wide range of applications, due to a combination of characteristics such as lack of pathogenicity and immunogenicity, wide range of cell tropism and long-term gene expression. Since its isolation, the biological properties of the adeno-associated virus have been increasingly understood, improving our ability to manipulate and use it as a safe and efficient gene therapy vector of wide spectrum. In this work, we review the bases of gene therapy, main types of gene transfer systems and basic properties and use of AAV vectors.

*Key words:* Adeno-associated virus, AAV-based recombinant vectors, gene therapy.

Received: August 29, 2007; Accepted: November 8, 2007.

### Introduction

Gene therapy is a clinical strategy involving gene transfer with therapeutic purposes. It is based on the concept that an exogenous gene (transgene) is able to modify the biology and phenotype of target cells, tissues and organs. Initially designed to definitely correct monogenic disorders, such as cystic fibrosis, severe combined immunodeficiency or muscular dystrophy, gene therapy has evolved into a promising therapeutic modality for a diverse array of diseases. Targets are expanding and currently include not only genetic, but also many acquired diseases, such as cancer, tissue degeneration or infectious diseases (Worgall, 2005; Zubler, 2006). Depending on the duration planned for the treatment, type and location of target cells, and whether they undergo division or are quiescent, different vectors may be used, involving nonviral methods, non-integrating viral vectors or integrating viral vectors (reviewed by El-Aneed, 2004; Zubler, 2006).

The first gene therapy clinical trial was carried out in 1989, in patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral transduc-

tion (Rosenberg *et al.*, 1990). In the early nineties, a clinical trial with children with combined immunodeficiency (SCID) was also performed, by retrovirus transfer of the deaminase adenosine gene to lymphocytes isolated from these patients (Blaese *et al.*, 1995). Since then, more than 5,000 patients have been treated in more than 1,000 clinical protocols all over the world (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>). Despite the initial enthusiasm, however, the efficacy of gene therapy in clinical trials has not been as high as expected; a situation further complicated by ethical and safety concerns (Verma and Somia, 1997; Rubanyi, 2001; El-Aneed, 2004; Edelstein *et al.*, 2004; Zubler, 2006). Further studies are being developed to solve these limitations.

### Vectors

The primary challenge in gene therapy is the development of efficient gene delivery vectors to target the selected tissues, where proper gene expression may be achieved. The ideal gene delivery method should be able to protect the transgene against degradation by nucleases, allow transport of the transgene into the nucleus of target cells, and have no potential inflammatory or cytotoxic side effects. However, the choice of the vector, as well as the protocol of treatment and the outcome of the therapy, are

Send correspondence to Nance Beyer Nardi. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: nardi@ufrgs.br.

determined mainly by the nature of the disease and by the target organ (Salani *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007). Therefore, other important parameters to be considered in the definition of the best type of vector include its purity and titer, efficiency, size limitations for insertion of transgenes, ability to infect dividing and/or quiescent cells, duration of expression of the transgene, integration into the host genome, tropism, and toxicity or immunogenicity of the vector (Goverdhanan *et al.*, 2005).

The introduction of therapeutic genes into target cells, leading to efficient and stable expression of the transgene with minimal adverse effects, can be achieved using viral and nonviral vectors. Viral vectors can mediate gene transfer with high efficiency and the possibility of long-term gene expression, since they can easily enter cells and deliver their genetic material into the nucleus; therefore, they are in most cases more efficient than nonviral delivery systems. However, the risks of immunogenicity and insertion mutagenesis, disclosed in gene therapy clinical trials, pose serious safety concerns about some commonly used viral vectors. Limitations in the size of the transgene that recombinant viruses can carry and issues related to the production of viral vectors present additional practical challenges.

In trying to bypass safety issues intrinsic to the use of viral vectors, several nonviral vectors are being developed (Goverdhanan *et al.*, 2005). Although significant progress has been made in studies on the basic biology and applications of various nonviral gene delivery systems, most of them are still much less efficient than viral vectors, particularly for *in vivo* gene delivery (Gao *et al.*, 2007).

### Non-viral systems

The underlying principle of nonviral vector systems is to complex the DNA vector with molecules that will facilitate DNA entry into the cells of interest. Complexed DNA binds to the cell membrane, triggering either nonspecific or receptor-mediated endocytosis. Upon entry into the cell, these complexes remain in endosomes, and their ability to escape before lysosomal enzymes destroy them is an essential characteristic of a successful nonviral vector.

Once released from the endosomes, these complexes must enter the nucleus and complexed DNA must be released from its carrier molecules and adequately transcribed.

Methods of nonviral gene delivery have been explored using physical (carrier-free gene delivery) and chemical approaches (synthetic vector-based gene delivery). Physical approaches, including needle injection, electroporation, gene gun, ultrasound, and hydrodynamic delivery, employ a force that permeates the cell membrane and facilitates intracellular gene transfer (Table 1). Chemical approaches use synthetic or naturally occurring compounds as carriers to deliver the transgene into cells (Table 2).

### Viral systems

For the production of efficient and safe viral vectors, essential sequences for viral particle assembly, genome package, and transgene delivery to target cells must be identified. Dispensable genes are then deleted from the viral genome in order to reduce its pathogenicity and immunogenicity and, finally, the transgene is integrated into the construct. Some viral vectors are able to integrate into the host genome, whereas others remain episomal. Integrating viruses result in persistent transgene expression. Non-integrating vectors, such as adenoviruses whose viral DNA is maintained in episomal form in infected cells, lead to transient transgene expression. Each type of vector presents specific advantages and limitations that make them appropriate for particular applications (Pfeifer and Verma, 2001). Most of the vectors currently used for gene transfer are derived from human herpesviruses, from which essential viral genes have been deleted to make them nonpathogenic. They usually have a broad tropism, so that different types of cells and/or tissues may be targeted.

The ideal vector has not been described yet, but its characteristics should include:

- easy and efficient production of high titers of the viral particle;
- absence of toxicity for target cells and undesirable effects such as immune response against the vector or the transgene;

**Table 1** - Physical methods of gene therapy with non-viral vectors.

Method	Description	Advantages	Limitations
Microinjection	Direct injection of plasmidial DNA into target cell	Small amount of DNA required for transference	Extremely difficult, low performance
Electroporation	Plasmidial DNA administration through application of an alternate electric field that breaks the membrane forming transient pores through of which DNA complexes can cross	High levels of transgene expression in several organs	Can cause local tissue damage and inflammation; depend on high plasmidial DNA concentrations
Biobalistic	Acceleration system by a carrier gas that projects the DNA molecule associated with microparticles of tungsten or gold, into target cells, promoting the intracellular expression of the exogen DNA	Allows transfection of complexes genes; absence of toxicity; efficacy of <i>in vitro</i> transfection relatively high	Use limited to superficial tissues and organs, as the muscle; shows limitations for the use <i>in vivo</i>

**Table 2** - Chemical methods of gene therapy with non-viral vectors.

Method	Description	Advantages	Limitations
Nude DNA	Direct injection of plasmidial DNA into target cell (non-complexed to any particle)	Successful transgene expression (1%-40%) transferred through nude DNA hydrodynamically* injected in mice	Fast degradation and neutralization by endogenous DNAses; limited potential of electrostatic interactions with anionic lipids of the cellular membrane (negative charge of DNA molecule); uncertain clinical applicability and problems for large-scale use
Lipoplexes	Cationic lipids complexed to DNA that neutralize its electrostatic charge, allowing DNA-cellular membrane interaction, and thus, increasing the transfection efficacy	Lipoplexes are powerful systems to introduce plasmids into target cells; high level transgene expression after direct administration or injection in target tissues	Interaction with plasmatic proteins and other extracellular proteins that can inactivate them due to their hydrophobic and cationic surface; indiscriminate transgene expression in cells at the administration site (non-specific membrane activity); low efficacy of quiescent cells transfection
Poliplexes	Non-particulate complexes formed by binding of DNA to cationic polymers	Idem to lipoplexes; possibility of choice of the ideal polymer structure to target cell transfection; easy to obtain in large-scale	Idem to lipoplexes

\*fast intravenous administration of a great volume (up to ~2.5 mL in mice).

- capacity of site-specific integration, allowing long-term transgene expression, for treating diseases such as genetic disorders;

- capacity of transduction of specific cell types;
- infection of proliferative and quiescent cells.

The most commonly used viral vectors for gene therapy are based on adenoviruses (Ad), adeno-associated viruses (AAV) and retrovirus/lentivirus vectors. Their main characteristics are summarized in Table 3.

### Adeno-associated viruses - structure and life cycle

Adeno-associated viruses (AAV) are non-pathogenic parvoviruses. The Parvoviridae family includes small, icosahedral and non-enveloped viruses whose genome is a single stranded DNA. AAV is one of the smallest viruses, with a capsid of approximately 22 nm, and one of the most frequent members of the family. Despite its high prevalence,

the virus has not been associated to any human illness. Since a co-infecting helper virus is required for productive infection, adeno-associated viruses are ascribed to a separate genus (Dependovirus) in the Parvoviridae family. Numerous serotypes of AAV have been identified, but the majority of rAAV vectors are based on AAV serotype 2 (AAV2).

The wild AAV2 life cycle in human cells consists first in its binding to a serotype-specific receptor/co-receptor at the cell surface followed by its entry into the cell through endocytosis. Then, the virus needs to escape from the endosome, uncoat and enter the nucleus. In the nucleus, the single-stranded (ss) viral DNA needs to be converted into double-stranded (ds) replicative intermediates, from which regulatory and structural viral proteins are transcribed, as well as the ssDNA for packaging into the new viral particles. This conversion is probably carried out by

**Table 3** - Main viral vector systems.

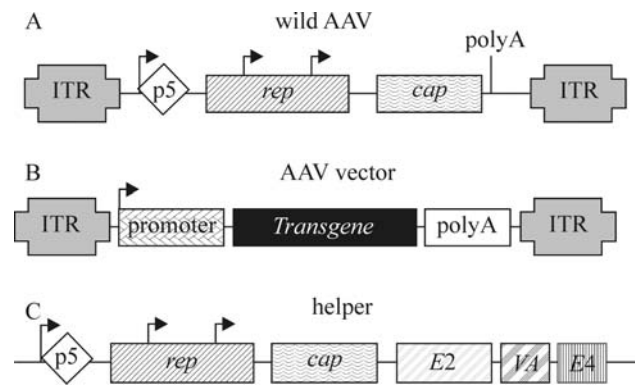
Viral vector	Description	Advantages	Limitations	Applications
Adenovirus (Ad)	Icosahedric, non- enveloped, genome of 36 kb, non-integrative	Easy propagation in high titers, infection of most cell types; insertion of large DNA fragments	High immunogenicity, inducing important cellular and humoral immune responses that can be fatal	Therapies that require transient gene expression: cancer therapy, angiogenesis induction and DNA vaccine production (due to its inflammatory and immunogenic properties)
Retroviruses (Retrovirus and Lentivirus)	Integrative in proliferative (retrovirus and lentivirus) and quiescent (lentivirus) cells	Low immunogenicity, possibility of insertion of large DNA fragments (up to 8 kb)	Insertional mutagenesis	Genetic diseases of T cells and hematological diseases (Retrovirus), HIV/AIDS
Adeno-associated virus (AAV)	Icosahedric, non- enveloped, single-stranded DNA, genome of 4.7 kb, integrative	Low immunogenicity, easy propagation in high titers, infection of most of cell types, long-term gene expression	Limited capacity for insertion of DNA fragments	Genetic diseases, tumors, neurological, ocular and cardiovascular diseases, others

some not yet identified cellular DNA repair mechanism (reviewed in Stender *et al.*, 2007). These dsDNA intermediates integrate into a specific site of human chromosome 19 (19q13.3q-ter) called AAVS1 (Kotin *et al.*, 1990; Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991; McCarty *et al.*, 2004; Philpott *et al.*, 2004; Wang and Lieber, 2006). In the absence of a co-infection by a helper virus (commonly adenovirus or herpesvirus), the integrated AAV genome remains in a latent state. When the host cell is co-infected by a helper virus, the changes of the cellular milieu lead to the activation of the integrated AAV dsDNA that initiates the transcription of the regulatory and structural viral genes, as well as the replication of viral DNA, generating the ssDNA to be packaged into novel viral particles. The viral DNA replication process relies on host cell polymerase activities, since AAV does not encode a proper polymerase (Ni *et al.*, 1998). Although the encapsidation process is still not well understood, there is evidence that it is a nuclear process (Wistuba *et al.*, 1997). This evidence also indicates that there are specific patterns of distribution and transport of viral proteins between cellular compartments in each stage of a productive infection. Capsid assembly probably occurs in the nucleolus and is then relocalized into the nucleoplasm, with some influence of Rep proteins. The colocalization of the empty assembled capsid, the Rep proteins and the ssDNA AAV genome in the nucleoplasm allows the encapsidation process to occur (Im and Muzyczka, 1989; Wistuba *et al.*, 1997; King *et al.*, 2001; Bleker *et al.*, 2005). Finally, the novel viral particles exit the cell, probably by an unknown exocytosis mechanism.

The wild AAV has a linear single-stranded DNA genome of approximately 4.7 kb of either plus or minus polarity. The AAV DNA ends are constituted of a 145 bp inverted terminal repeat (ITR), whose terminal 125 bases are multipalindromic, leading to a characteristic T-shaped hairpin structure (Koczo *et al.*, 1973). This structure becomes a 3' hydroxyl group available as a primer for the initiation of viral DNA replication (Berns, 1990).

The ITRs that act as DNA replication origin, packaging and integration signal, also act as a regulator element for wild AAV gene expression. Two viral genes located between the ITRs, *rep* and *cap*, encode proteins involved in viral replication and capsid formation, respectively (Figure 1A). The *rep* gene encodes four regulatory proteins called Rep78, Rep68, Rep52 and Rep40, according to their molecular weight. This is possible due to the use of two alternative promoters (p5 and p19) and an internal splice donor and acceptor site.

Rep78 and Rep68 are site-specific DNA binding proteins that interact with specific sites within the ITRs (Rep-binding element - RBE - and terminal resolution site - *trs*), playing a crucial role in DNA replication, transcriptional control and site-specific integration processes. They also act as positive or negative regulators of AAV gene expression, depending on the presence or absence of a helper vi-



**Figure 1** - AAV genetic structure. (A) Wild AAV; (B) AAV vector cassette, containing only the ITRs of the wild virus and the transgene and its promoter; (C) helper cassette, containing the AAV *rep* and *cap* genes required for virus packaging and the Ad genes E2, VA and E4, required for virus replication (adapted from Pfeifer and Verma, 2001).

rus, respectively (Pereira *et al.*, 1997). Moreover, these proteins have endonuclease (Berns and Giraud, 1996), helicase and ATPase (Im and Muzyczka, 1990) activities.

The Rep52 and Rep40 proteins participate in the generation and accumulation of the plus and minus ssDNA viral genome from the dsDNA intermediates (Chejanovsky and Carter, 1989). The single-stranded genomes of both polarities are packaged with equal efficiency (Berns and Adler, 1972). Similar to Rep78 and Rep68, these proteins also exhibit helicase and ATPase activities (Smith and Kotin, 1998; Collaco *et al.*, 2003).

The *cap* gene has a single promoter (p40) that transcribes two messenger RNA through alternative splicing at two acceptor sites. The larger mRNA encodes the virion protein 1 (VP1), the largest protein subunit of the capsid (~87 kDa). The shorter transcript presents a conventional initiation codon (AUG), which originates the VP3 capsid protein (~62 kDa), and an upstream non-canonical start codon (ACG) that generates VP2 (~72 kDa). These three capsid proteins differ among them at the N terminus. VP1, VP2 and VP3 assemble in a molar ratio of 1:1:10, respectively, forming a near-spherical protein shell of 60 subunits that leads to perfect icosahedral symmetry (Bleker *et al.*, 2005). A conserved phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) motif, located within the VP1 N-terminal region (Zádori *et al.*, 2001), was reported to have a biological significance in AAV2 infection (Girod *et al.*, 2002). It seems to play a crucial role in the trafficking of the AAV genome from the endosome to the nucleus and in the initiation of viral gene expression (Girod *et al.*, 2002; Bleker *et al.*, 2005).

#### Adeno-associated virus biology and trafficking in host cells

As mentioned above, AAV infection is initiated by binding to cell surface receptors that are serotype-specific. AAV2, for instance, has the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) as one of its primary attachment receptors (Sum-



merford and Samulski, 1998). The binding to a receptor is not a sufficient stimulus for viral internalization, which, additionally, requires binding to co-receptors, such as  $\alpha_v\beta_5$  integrin heterodimers (Summerford *et al.*, 1999), fibroblast growth factor receptor type 1 (Qing *et al.*, 1999) and the hepatocyte growth factor receptor, c-Met (Kashiwakura *et al.*, 2005). HSPG is ubiquitously distributed in cells and tissues of several species. This can explain in part the broad tropism of this virus that includes human, non-human primate, canine, murine and avian cell types. N- and O-linked sialic acids act as receptors for AAV5 and AAV4, respectively (Kaludov *et al.*, 2001). The platelet-derived growth factor receptor has been identified as another cellular determinant involved in AAV5 infection (Di Pasquale *et al.*, 2003).

Different AAV serotypes preferentially transduce different cell types (Burger *et al.*, 2004). In general, the tropism is associated with abundance of the specific receptor/coreceptor, but there are exceptions (Duan *et al.*, 1999; Duan *et al.*, 2000), suggesting that probably there are other internalization pathways independent of known receptors (Ding *et al.*, 2005).

The events that control rAAV transduction following receptor binding and leading to nuclear uptake have been found to be a major rate-limiting step in rAAV transduction for many cell types. Some studies in this area have also suggested that the rate of intracellular processing and the process of uncoating of viral vectors may critically affect host immune responses toward input capsids, in the absence of new viral protein synthesis (Campbell and Hope, 2005; Ding *et al.*, 2005).

The current knowledge of AAV trafficking is based on a limited number of serotypes, particularly AAV2 and AAV5, and there are relatively few reports about intracellular trafficking for any of the other AAV serotypes. The knowledge of the intracellular processing in these and other existing serotypes is becoming even more important with the increasing identification of new AAV serotypes (Campbell and Hope, 2005; Ding *et al.*, 2005).

Although current advances in technology have greatly increased our ability to dissect the complexities of AAV intracellular trafficking, the events and processes that regulate the trafficking of AAV particles into the nucleus are still not fully understood. *In vitro* experiments have indicated that one of the routes this virus can use to get through the plasma membrane involves receptor-mediated endocytosis, via the formation of clathrin-coated pits (Duan *et al.*, 1999; Bartlett *et al.*, 2000). Other studies have suggested that internalized virions escape from endosomes and are released in the cytosol by a low pH-dependent process (Bartlett *et al.*, 2000). In addition, experiments employing a powerful new imaging technique that enables real-time monitoring of the trajectories of individual virions (Seisenberger *et al.*, 2001) have shown that each endosome carries a single AAV particle. There are reports that support the in-

volvement of microtubule assembly and motor proteins in active AAV intracellular transport. It has also been suggested that AAV particles can access the nucleus through the nuclear pore complex (NPC) due to their very small size. However, recent research points to a nuclear entry process that is not dependent on NPC activity (Hansen *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2002), whereas the issue of whether AAV capsids enter nuclei intact or remodeled seems to depend on the presence or absence, respectively, of co-infecting helper Ad particles (Xiao *et al.*, 2002).

After reaching the nucleus, the wild-type AAV2 is able to integrate into the host genome in dividing cells and, at a lesser frequency, also in non-dividing cells. This integration occurs preferentially into a specific site of the q arm of chromosome 19 (AAVS1) in a Rep-dependent manner (Kotin *et al.*, 1990; Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991; McCarty *et al.*, 2004; Philpott *et al.*, 2004; Wang and Lieber, 2006). Specific integration sites for the other AAV serotypes have not yet been identified.

#### Adeno-associated virus serotypes

Human AAV was discovered as a contaminant of adenovirus (Ad) preparations in 1965 (Atchison *et al.*, 1965). After the establishment of the first infectious clone of AAV2 in 1982 (Samulski *et al.*, 1982), it has rapidly gained popularity in gene therapy applications, due to characteristics such as lack of pathogenicity, wide range of infectivity, and ability to establish long-term transgene expression.

Up to date, several AAV serotypes and over 100 AAV new isolates have been acquired from adenovirus stocks or from human/nonhuman primate tissues (Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Parks *et al.*, 1967; Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984; Rutledge *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2006). The over 100 new AAV isolates are called AAV variants since their serology is not currently available. Alternative AAV serotypes can result in lower vector load requirements due to their potentially higher transduction efficiency. They also help to evade preexisting neutralizing antibodies generated as a result of humoral immune responses to natural infection. Moreover, as more serotypes are characterized and the capsids of the different serotypes are combined to obtain new tropisms, it will be possible that tissues not easily infected by known AAV serotypes become susceptible to gene transfer based on this vector, expanding and complementing the current range of AAV-based vectors.

By definition, a new serotype is a newly isolated virus that does not efficiently cross-react with neutralizing sera specific for all other existing and characterized serotypes. In this way, only AAV1 to AAV5 and AAV7 to AAV9 can be defined as real serotypes. Variants AAV6, AAV10 and AAV11 do not appear to fit into this definition, since the serology of AAV6 is similar to that of AAV1 (Gao *et al.*,

2002; Grimm and Kay, 2003; Gao *et al.*, 2004), and serological profiles of AAV10 and AAV11 are not well characterized yet (Mori *et al.*, 2004).

There is evidence that the *in vivo* transduction efficiency of one AAV vector serotype is generally unaffected by preexisting neutralizing antibodies to another serotype (Xiao *et al.*, 1999; Halbert *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2004). However, there are also reports that indicate that the extent of AAV serotype cross-reactivity could be species-specific or dependent on target tissue and route of administration (Wu *et al.*, 2006).

With exemption of AAV5, which was isolated from a human penile condylomatous wart (Bantel-Schaal and Hausen, 1984), AAV serotypes 1 to 6 were isolated as contaminants in laboratory adenovirus stocks. Since there is a relatively high prevalence of neutralizing antibodies in human populations against AAV2, AAV3 and AAV5, these serotypes are thought to be of human origin (Blacklow *et al.*, 1968; Parks *et al.*, 1970; Georg-Fries *et al.*, 1984; Erles *et al.*, 1999). In contrast, AAV4 is thought to originate from monkey samples since antibodies against it are common in nonhuman primates (Parks *et al.*, 1970). Antibodies to AAV1 were found in monkey sera (Parks *et al.*, 1970), whereas AAV1 viral genomes have been isolated from human tissues (Gao *et al.*, 2004). Therefore, it still remains an open question whether AAV1 originated from humans or from nonhuman primates.

AAV6 is thought to be a hybrid recombinant between AAV1 and AAV2, since its left ITR and p5 promoter regions are virtually identical to those of AAV2, while the rest of its genome is nearly identical to that of AAV1 (Rutledge *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999). However, it is not clear whether recombination occurred *in vivo* or *in vitro*.

In the past 4 years, several novel AAV serotypes, including AAV7, 8 and 9, and over 100 AAV variants have been found in human or nonhuman primate tissues (Gao *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005). Different from AAV1 to 6, the new AAV serotypes and variants were not isolated as live virus forms; instead, they were isolated as DNA sequences using a specific PCR-based strategy (Gao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005).

AAV genomes have not been isolated only from primates, but also from other species such as horse (Dutta, 1975), lizard (Jacobson *et al.*, 1996), chicken (Bossis and Chiorini, 2003), cow (Schmidt *et al.*, 2004), snake (Farkas *et al.*, 2004) and goat (Olson *et al.*, 2004; Arbetman *et al.*, 2005). Among these, AAV isolates from bovine, avian and caprine species have been developed into vectors for gene transfer studies (Schmidt *et al.*, 2004; Bossis and Chiorini, 2003; Arbetman *et al.*, 2005).

These AAV serotypes share a common genome structure, but show variation in cell and tissue tropism due to differences in their capsid proteins that lead to recognition by different cell surface receptors. The more commonly used

serotype for vector production is still AAV2 which exceedingly infects the brain, retina and kidney, and is being widely used in applications involving these organs. AAV1 and AAV7 show a major tropism for skeletal muscle. AAV4 and AAV5 appear to have a stronger tropism for the central nervous system and photoreceptor cells. Finally, AAV8 shows greater tropism for heart, pancreas, liver and muscle; and AAV9, for lung, muscle and liver (Ding *et al.*, 2005; reviewed in Wu *et al.*, 2006).

### AAV-based recombinant vectors

All AAV-based vectors are derived from a plasmid that has only the AAV 145 bp inverted terminal repeats (ITRs) flanking the cassette with the transgene of choice. Since all required *cis* functions for vector production are located in the ITR region and in the immediately adjacent 45 nucleotides, the two open reading frames (ORFs), *rep* and *cap*, can be completely replaced by the transgene of interest and its promoter (Figure 1B). Vectors with up to 5.2 kb size can be packaged, although the optimal size for the AAV vector genome is between 4.1 and 4.9 kb. The *rep* and *cap* genes are provided in another plasmid, the package plasmid (Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001). Acquisition of rAAV used to require the transfection of both constructs in Ad infected cells (Pfeifer and Verma, 2001). Since there is no homology between vector and helper sequences, rAAVs produced in this system are essentially free from wild AAV. This minimizes the possibility of undesirable gene expression that causes host immune responses, as observed for other vectors. In addition to the AV capacity to infect both mitotic and post-mitotic cells, recent *in vivo* studies are resulting in efficient and persistent gene transfer to several tissues, organs and systems, including the central nervous system, retina, muscle, lung and liver (reviewed in Xiao and Samulski, 1998; Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001).

Although wild AAV is able to integrate into the host genome in a specific site on chromosome 19, this site-specific integration requires the viral protein Rep that is normally absent in current AAV vectors (Kotin *et al.*, 1990; Linden *et al.*, 1996). Therefore, common AAV vectors usually remain within the target tissues as episomal entities (90%), although they can also integrate into the host cell's genome (10%) (Goverdhanan *et al.*, 2005). The extent to which recombinant genomes are able to integrate in the absence of Rep functions is still in discussion. Recently, the preferential integration of AAV2 vectors in transcriptionally active chromatin regions in hepatocytes has been demonstrated (Nakai *et al.*, 2003; Russell, 2003). Whether this is a general phenomenon, or specific for liver or AAV2, has to be further investigated. Although usually remaining in an episomal form, AAV vectors can lead to long-term transgene expression in comparison to other vectors. However, the development of a superior class of AAV-based vectors is required to ensure host genome integration.

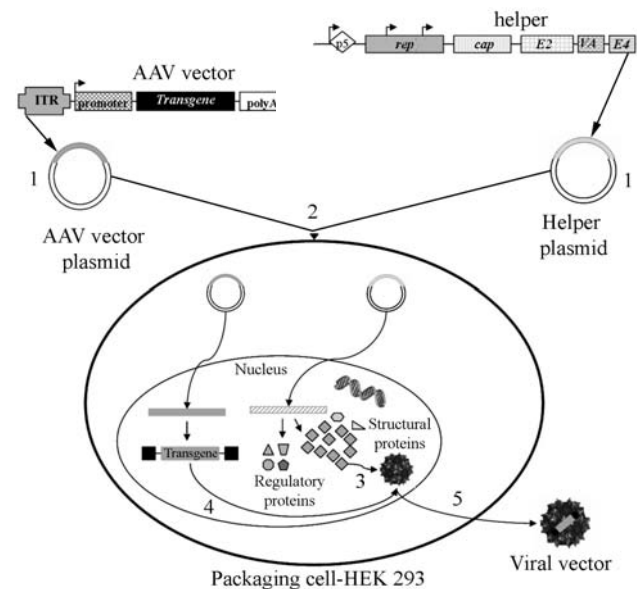
Although involved in wild AAV gene expression, ITR sequences are excluded from the helper plasmid to avoid generation of recombinant wild AAV. The AAV promoter region p5 also acts as an enhancer in the regulation of expression of proteins p19 and p40, Rep52/42 and Cap. Therefore, gene expression of packaged plasmid should be optimized for Rep and Cap expression in order to achieve efficient vector replication and packaging. Overexpression of AAV Rep 78/68 by the replacement of p5 promoter with strong heterologous promoters results in a considerably lower rAAV production. On the other hand, Rep 78/68 underexpression, through replacement of the initiation codon ATG by ACG and addition of a second copy of the p5 promoter 3' from *Cap*, inhibiting its own transcriptional activity, results in higher rAAV production (approximately 15 fold more than by conventional package plasmids). This suggests that proper regulation of AAV gene expression has a crucial role in rAAV production, and that the handling of the package plasmid to optimize gene expression can lead to an improvement in vector production. Moreover, the proper supply of helper functions from Ad essential genes is also crucial, since these genes regulate AAV gene expression and also modify the cellular microenvironment to allow AAV spreading (Tal, 2000; Pfeifer and Verma, 2001; Smith, 2003).

As mentioned previously, a remarkable characteristic of AAV is the requirement of co-infection with a non-related virus, such as Ad, to supply essential helper functions for a productive viral cycle. Several adenoviral genes, including *E1a*, *E1b*, *E2a*, *E4* and *VA RNA* have these helper functions. *E1a* acts as a transactivator, overregulating the transcriptional activity of various Ad genes, as well as AAV *rep* and *cap* genes. The *E1b* gene interacts with *E4* facilitating viral mRNA transport in the appropriate moment. The *E4* gene, especially ORF 6, is also involved in the facilitation of AAV DNA replication. *E2a* and *VA RNA* genes increase the stability and efficacy of AAV mRNA translation, especially for *Cap* gene transcripts (Pfeifer and Verma, 2001).

Although this is the most efficient procedure to introduce Ad helper genes, several problems arise as a result of Ad infection. The first is the requirement to remove contaminating Ad particles. Moreover, the inherent competition between AAV and Ad for critical viral gene functions affects the final vector production. The complete removal of Ad is based on physical techniques that include CsCl<sub>2</sub> chromatography and a step of heat denaturation in order to inactivate any Ad residual particles (Vincent *et al.*, 1997). Although the majority of these procedures is well succeeded to a certain level, potential Ad contamination is still an undesirable risk and the presence of denatured Ad proteins is unacceptable for clinical purposes. Therefore, the possibility of producing rAAV in the absence of Ad, as described by Xiao and Samulski (1998), through a system of three plasmids, a rAAV vector plasmid, a package

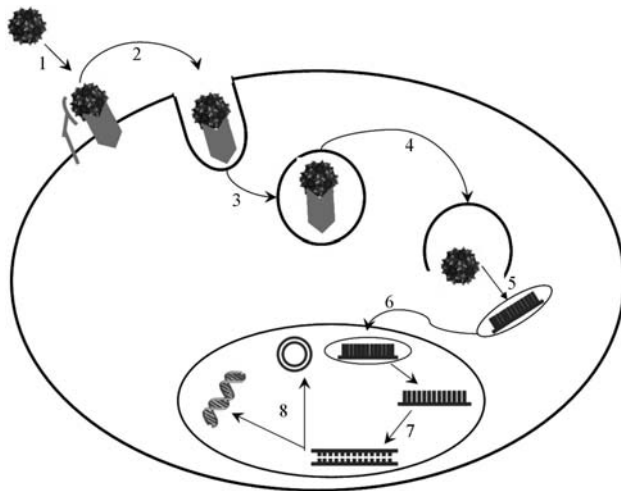
plasmid (with *rep* and *cap* genes) and a helper plasmid (containing only the Ad5 genes *E2a*, *E4* and *VA RNA*), constitutes a promising alternative for the potentialization of AAV vectors in gene therapy. More recently, efficient systems with only two plasmids - a rAAV vector plasmid and the helper containing the AAV and Ad genes required for package and replication - have been described (Zolotukhin *et al.*, 2002) (Figure 1C). In all cases, the cell packaging line used is HEK293, whose genome contains the Ad *E1* gene (Figure 2).

Despite the currently great number of available recombinant AAV (rAAV) serotypes and variants, several biological barriers appear to limit the effectiveness of rAAVs for gene therapy. Understanding the fundamental basis of these barriers has aided in establishing methods to improve the efficiency of rAAV-mediated gene delivery. These biological barriers are inherent to the AAV life cycle and to its infectious process, as already described above (Figure 3) (Ding *et al.*, 2005). Each intracellular stage required for successful AAV infection constitutes a barrier for rAAV cell transduction. AAV entry pathways probably determine the routes by which the virus crosses the cell cytoplasm to enter into the nucleus. Consequently, viral receptors and coreceptors involved in endocytosis and movement of AAV through the endosomal compartment should be the focus of intracellular trafficking studies.



**Figure 2** - AAV recombinant vector production. Insertion of the AAV vector and helper cassettes into the respective plasmids (1); co-transfection of both plasmids in HEK 293 packaging cells, whose genome contains the Ad E1 gene, which together with the other Ad required genes, supplied by the helper plasmid, allows the establishment of a productive infection (2); empty capsid is formed by AAV structural proteins assembly into the nucleolus (3); the replicated ssDNA viral genome with the transgene flanked by ITRs (vector plasmid) are packaged into the empty capsid in the nucleoplasm (4), giving rise to a non-replicative recombinant AAV vector virion (5). The regulatory proteins act especially in the replication and packaging processes.





**Figure 3** - Course of AAV productive infection. Scheme showing the eight steps of AAV transduction of host cells: (1) viral binding to a membrane receptor/coreceptor; (2) endocytosis of the virus by the host cell; (3) virus intracellular trafficking through the endosomal compartment; (4) escape of the virus from the endosome; (5) virion uncoating; (6) entry into the nucleus; (7) viral genome conversion from a single-stranded to a double-stranded genome; and (8) integration into the host genome or permanence of an episomal form capable of expressing an encoded gene (adapted from Ding *et al.*, 2005).

### AAV-based vectors gene therapy applications

The establishment of the first infectious clone of AAV serotype 2 (AAV2) in 1982 (Samulski *et al.*, 1982) and the pioneering work on the successful cloning of AAV, also in the early 1980s, laid the foundation of recombinant AAV vectors capable of expressing foreign genes in mammalian cells (Laughlin *et al.*, 1983; Hermonat and Muzyczka, 1984). Since then AAV2 vectors have rapidly gained popularity in gene therapy applications, due to their unique and desirable biological features (reviewed by Coura and Nardi, 2007). This class of viruses has adapted to co-exist with mammalian hosts in a manner that allows for long-term persistence without any detectable deleterious effect on the host. Despite the deceptively simple structure of AAV, this virus is able to use its nonstructural proteins to facilitate replication as a satellite of other DNA viruses during its productive phase, as well as to establish stable integrated and episomal forms during its latent phase (Berns *et al.*, 1975; Berns, 1990; Berns and Linden, 1995). Therefore, the nonpathogenic and persistent long-term nature of AAV infection combined with its wide range of infectivity has made this virus an important candidate as a therapeutic gene transfer vector.

Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors have rapidly advanced to the forefront of gene therapy in the past decade, since they have been successfully overcoming gene therapy challenges such as transgene maintenance, security, host immune response and target diseases, and meeting the desirable vector system features of high level of safety combined with clinical efficacy and versatil-

ity in terms of potential applications. Consequently, despite the already existing limitations and concerns to be resolved, rAAV are increasingly becoming the vectors of choice for a wide range of gene therapy approaches.

Until recently, the better studied and the most frequently used AAV serotype for gene therapy was AAV2. Other new serotypes, however, are gaining more and more popularity. Recombinant AAV2 vectors have been tested in preclinical studies for a variety of diseases such as genetic diseases (hemophilia,  $\mu$ 1-anti-trypsin deficiency, cystic fibrosis, Duchenne muscular dystrophy and others) (Hildinger and Auricchio, 2004), tumors (Ng *et al.*, 2007), neurological disorders (Paterna *et al.*, 2007), ocular (Martin *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005) and cardiovascular diseases (Jazwa *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Shenouda *et al.*, 2006), chronic disorders (Ideno *et al.*, 2007; Blenman *et al.*, 2006; Sandalon *et al.*, 2007) and others.

Several clinical trials have already been performed for various diseases, especially monogenic diseases and tumors. Currently, there are more than 20 open clinical trials evaluating the use of AAV vectors for genetic and acquired diseases (Pfeifer and Verma, 2001; Worgall, 2005; Clinical trial database - <http://www.wiley.com.uk/genetherapy/clinical/>).

### Future directions

Since its isolation, the biological properties of the adeno-associated virus have been increasingly understood, improving our ability to manipulate and use it as a safe and efficient gene therapy vector of wide spectrum. AAV-based vectors seem to bypass the main gene therapy barriers, such as long-term and stable transgene expression in many tissues, safety, broad range of target diseases and lack of immunogenicity and pathogenicity. However, although some obstacles have already been overcome, others are rising and need to be surpassed now, and research advances will certainly bring more challenges in the near future.

### Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through the program Instituto do Milênio - Rede de Terapia Gênica.

### References

- Arbetman AE, Lochrie M, Zhou S, Wellman J, Scallan C, Doudrick MM, Radley B, Patarroyo-White S, Liu T, Smith P *et al.* (2005) Novel caprine adeno-associated virus (AAV) capsid (AAVGo1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J Virol* 79:15238-15245.
- Atchison RW, Casto BC and Hammon M (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149:754-756.

- Bantel-Schaal U and zur Hausen H (1984) Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 134:52-63.
- Bartlett JS, Wilcher R and Samulski RJ (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74:2777-2785.
- Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF and Hoggan MD (1975) Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68:556-560.
- Berns K (1990) Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54:316-329.
- Berns KI and Adler S (1972) Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J Virol* 9:394-396.
- Berns KI and Linden RM (1995) The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17:237-245.
- Berns KI and Giraud C (1996) Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 218:1-23.
- Blacklow NR, Hoggan MD and Rowe WP (1968) Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* 40:319-327.
- Blaese RM, Culver KC, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Sheare G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ *et al.* (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.
- Bleker S, Sonntag F and Kleinschmidt JA (2005) Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J Virol* 79:2528-2540.
- Blenman KR, Duan B, Xu Z, Wan S, Atkinson MA, Flotte TR, Croker BP and Morel L (2006) IL-10 regulation of lupus in the NZM2410 murine model. *Lab Invest* 86:1136-1148.
- Bossis I and Chiorini JA (2003) Cloning of an avian adeno-associated virus (AAV) and generation of recombinant AAV particles. *J Virol* 77:6799-6810.
- Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ and Muzyczka N (2004) Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10:302-317.
- Campbell EM and Hope TJ (2005) Gene therapy progress and prospects: Viral trafficking during infection. *Gene Ther* 12:1353-1359.
- Chejanovsky N and Carter BJ (1989) Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: Effects on viral DNA replication. *Virology* 173:120-128.
- Collaco RF, Kalman-Maltese V, Smith AD, Dignam JD and Trempe JP (2003) A biochemical characterization of the adeno-associated virus rep40 helicase. *J Biol Chem* 278:34011-34017.
- Coura RD and Nardi NB (2007) The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* 4:99.
- Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A and Chiorini JA (2003) Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 9:1306-1312.
- Ding W, Zhang L, Yan Z and Engelhardt JF (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12:873-880.
- Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE and Engelhardt JF (1999) Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 73:10371-10376.
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J and Engelhardt JF (2000) Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 105:1573-1587.
- Dutta SK (1975) Isolation and characterization of an adenovirus and isolation of its adenovirus-associated virus in cell culture from foals with respiratory tract disease. *Am J Vet Res* 36:247-250.
- Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J and Edelstein RM (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 6:597-602.
- El-Anead A (2004) Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 498:1-8.
- Erles K, Sebokova P and Schlehofer JR (1999) Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 59:406-411.
- Farkas SL, Zadori Z, Benko M, Essbauer S, Harrach B and Tijssen P (2004) A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus Dependovirus. *J Gen Virol* 85:555-561.
- Gao G, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J and Wilson JM (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11854-11859.
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X and Wilson JM (2004) Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78:6381-6388.
- Gao G, Vandenberghe LH and Wilson JM (2005) New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5:285-297.
- Gao X, Kim K-S and Liu D (2007) Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J* 9:E92-E104.
- Georg-Fries B, Biedlerack S, Wolf J and zur Hausen H (1984) Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134:64-71.
- Girod A, Wobus CE, Zádori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt JA and Hallek M (2002) The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 83:973-978.
- Goverdhana S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J *et al.* (2005) Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: Progress and future challenges. *Mol Ther* 12:189-211.
- Grimm D and Kay MA (2003) From virus evolution to vector revolution: Use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3:281-304.
- Halbert CL, Rutledge EA, Allen JM, Russell DW and Miller AD (2000) Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 74:1524-1532.
- Hansen J, Qing K and Srivastava A (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Altered endocytic pro-

- cessing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* 75:4080-4090.
- Hermonat PL and Muzyczka N (1984) Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6466-6470.
- Hildinger M and Auricchio A (2004) Advances in AAV-mediated gene transfer for the treatment of inherited disorders. *Eur J Hum Genet* 12:263-271.
- Hoggan MD, Blacklow NR and Rowe WP (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: Physical, biological and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:1467-1472.
- Ideno J, Mizukami H, Kakehashi A, Saito Y, Okada T, Urabe M, Kume A, Kuroki M, Kawakami M, Ishibashi S *et al.* (2007) Prevention of diabetic retinopathy by intraocular soluble flt-1 gene transfer in a spontaneously diabetic rat model. *Int J Mol Med* 19:75-79.
- Im DS and Muzyczka N (1989) Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol* 63:3095-3104.
- Im DS and Muzyczka N (1990) The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61:447-457.
- Jacobson ER, Kopit W, Kennedy FA and Funk RS (1996) Coinfection of a bearded dragon, *Pogona vitticeps*, with adeno-virus- and dependovirus-like viruses. *Vet Pathol* 33:343-346.
- Jazwa A, Jozkiewicz A and Dulak J (2007) New vectors and strategies for cardiovascular gene therapy. *Curr Gene Ther* 7:7-23.
- Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J and Chiorini JA (2001) Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75:6884-6893.
- Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K and Daida H (2005) Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79:609-614.
- King JA, Dubielzig R, Grimm D and Kleinschmidt JA (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* 20:3282-3291.
- Koczot FJ, Carter BJ, Garon CF and Rose JA (1973) Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:215-219.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M and Berns KI (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2211-2215.
- Kotin RM, Menninger JC, Ward DC and Berns KI (1991) Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10:831-834.
- Laughlin CA, Tratschin JD, Coon H and Carter BJ (1983) Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* 23:65-73.
- Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E and Berns KI (1996) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11288-11294.
- Liu Y, Li D, Chen J, Xie J, Bandyopadhyay S, Zhang D, Nemarkomula AR, Liu H, Mehta JL and Hermonat PL (2006) Inhibition of atherosclerosis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10. *Atherosclerosis* 188:19-27.
- Martin KR, Klein RL and Quigley HA (2002) Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 28:267-275.
- McCarty DM, Young Jr SM and Samulski RJ (2004) Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38:819-845.
- Mori S, Wang L, Takeuchi T and Kanda T (2004) Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: Pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330:375-383.
- Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M and Kay MA (2003) AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34:297-302.
- Ng SS, Gao Y, Chau DH, Li GH, Lai LH, Huang PT, Huang CF, Huang JJ, Chen YC, Kung HF *et al.* (2007) A novel glioblastoma cancer gene therapy using AAV-mediated long-term expression of human TERT C-terminal polypeptide. *Cancer Gene Ther* 14:561-572.
- Ni T-H, McDonald WF, Zolotukhin I, Melendy T, Waga S, Stillman B and Muzyczka N (1998) Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol* 72:2777-2787.
- Olson EJ, Haskell SR, Frank RK, Lehmkühl HD, Hobbs LA, Warg JV, Landgraf JG and Wunschmann A (2004) Isolation of an adenovirus and adeno-associated virus from goat kids with enteritis. *J Virol* 78:461-464.
- Parks WP, Green M, Pina M and Melnick JL (1967) Physicochemical characterization of adeno-associated satellite virus type 4 and its nucleic acid. *J Virol* 5:980-987.
- Parks WP, Boucger DW, Melnick JL, Taber LH and Yow MD (1970) Seroepidemiological and ecological studies of the adeno-associated satellite viruses. *Infect Immun* 2:716-722.
- Paterna JC, Leng A, Weber E, Feldon J and Büeler H (2007) DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther* 15:698-704.
- Peden CS, Burger C, Muzyczka N and Mandel RJ (2004) Circulating anti-wildtype adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* 78:6344-6359.
- Pereira DJ, McCarty DM and Muzyczka N (1997) The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* 71:1079-1088.
- Pfeifer A and Verma IM (2001) Gene therapy: Promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177-211.
- Philpott NJ, Gomos J and Falck-Pedersen E (2004) Transgene expression after rep-mediated site-specific integration into chromosome 19. *Hum Gene Ther* 15:47-61.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V and Srivastava A (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-



- receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5:71-77.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC and Topalian SL (1990) Gene transfer into humans - Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323:570-578.
- Rubanyi GM (2001) The future of human gene therapy. *Mol Aspects Med* 22:113-142.
- Russell DW (2003) AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34:241-242.
- Rutledge EA, Halbert CL and Russell DW (1998) Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 72:309-319.
- Salani B, Damonte P, Zingone A, Barbieri O, Chou JY, D'Costa J, Arya SK, Eva A and Varesio L (2005) Newborn liver gene transfer by an HIV-2-based lentiviral vector. *Gene Ther* 12:803-814.
- Samulski RJ, Berns KI, Tan M and Muzyczka N (1982) Cloning of infectious adeno-associated virus into pBR322: Rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2077-2081.
- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N and Hunter LA (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10:3941-3950.
- Sandalon Z, Bruckheimer EM, Lustig KH and Burstein H (2007) Long-term suppression of experimental arthritis following intramuscular administration of a pseudotyped AAV2/1-TNFR:Fc vector. *Mol Ther* 15:264-269.
- Schmidt M, Katano H, Bossis I and Chiorini JA (2004) Cloning and characterization of a bovine adeno-associated virus. *J Virol* 78:6509-6516.
- Schmidt M, Grot E, Cervenka P, Wainer S, Buck C and Chiorini JA (2006) Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 80:5082-5085.
- Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M and Brauchle C (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adenoassociated virus. *Science* 294:1929-1932.
- Shenouda SM, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I and Gavras H (2006) Long-term inhibition of the central alpha(2B)-adrenergic receptor gene via recombinant AAV-delivered antisense in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 19:1135-1143.
- Smith KR (2003) Gene therapy: Theoretical and bioethical concepts. *Arch Med Res* 34:247-268.
- Smith RH and Kotin RM (1998) The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J Virol* 72:4874-4881.
- Smith JR, Verwaerde C, Rolling F, Naud MC, Delanoye A, Thillaye-Goldenberg B, Apparailly F and De Kozak Y (2005) Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intracellular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum Gene Ther* 16:1037-1046.
- Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Soballe K and Barry F (2007) Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 13:93-99.
- Summerford C and Samulski RJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-1445.
- Summerford C, Bartlett JS and Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: A coreceptors for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.
- Tal J (2000) Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *J Biomed Sci* 7:279-291.
- Verma IM and Somia N (1997) Gene therapy - Promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
- Vincent KA, Piraino ST and Wadsworth SC (1997) Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products. *J Virol* 71:1897-1905.
- Wang H and Lieber A (2006) A helper-dependent capsid-modified adenovirus vector expressing adeno-associated virus rep78 mediates site-specific integration of a 27-kilobase transgene cassette. *J Virol* 80:11699-11709.
- Wiley (2007) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/> (June, 2007).
- Wistuba A, Kern A, Weger S, Grimm D and Kleinschmidt J (1997) Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71:1341-1352.
- Worgall S (2005) A realistic chance for gene therapy in the near future. *Pediatr Nephrol* 20:118-124.
- Wu Z, Asokan A and Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: Vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316-327.
- Xiao X, Li J and Samulski J (2006) Production of high-titer recombinant adenoassociated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72:2224-2232.
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G and Wilson JM (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73:3994-4003.
- Xiao W, Warrington Jr KH, Hearing P, Hughes J and Muzyczka N (2002) Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 76:11505-11517.
- Zádori Z, Szelei J, Lacoste M-C, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR and Tijssen P (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* 1:291-302.
- Zolotukhin S, Potter M, Zolotukhin I, Sakai Y, Loiler S, Fraites TJ Jr, Chiodo VA, Phillipsberg T, Muzyczka N, Hauswirth WW *et al.* (2002) Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28:158-67.
- Zubler RH (2006) *Ex vivo* expansion of haematopoietic stem cells and gene therapy development. *Swiss Med Wkly* 136:795-799.

Associate Editor: Carlos F.M. Menck

**- OBJETIVO -**

## **OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo principal o estabelecimento de um protocolo de terapia gênica baseada em vírus adeno-associado para o tratamento da mucopolissacaridose tipo I, especialmente das manifestações e do comprometimento do SNC, em um modelo murino da doença.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1) Avaliar a eficácia e a viabilidade de um protocolo de terapia gênica com AAV2.5-IDUA direcionado ao tratamento das manifestações do SNC em um modelo murino de MPSI;
- 2) Avaliar e acompanhar ao longo do tempo, em todos os grupos de tratamento, as possíveis alterações nos parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos, imunológicos, histológicos e genéticos.
- 3) Estabelecer padrão de distribuição de MSC, contendo o gene repórter GFP, após administração através de diferentes vias, a fim de fornecer subsídios para a avaliação da terapia celular para MPSI;

**CAPITULO II**  
**- TERAPIA GÊNICA-**

### **III. AAV2.5 BRAIN-DIRECTED GENE THERAPY IN MPSI**

**MICE**

***MANUSCRITO EM FASE FINAL DE PREPARAÇÃO***



## **AAV2.5 brain-directed gene therapy in MPSI mice**

Renata Coura<sup>1</sup>, Sandrine Vitry<sup>2</sup>, Stephanie Bigou<sup>2</sup>, Jérôme Ausseil<sup>2</sup>, Nance Beyer Nardi<sup>1</sup> and Jean Michel Heard<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Retrovirus and Gene Transfer Unity, Neuroscience Department, Institut Pasteur, Paris, France.

*Corresponding author:* Nance Beyer Nardi. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Laboratório de Imunogenética, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: nardi@ufrgs.br.

## INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis (MPS) type I is a lysosomal storage disease characterised by a deficiency of the enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), which is required for the sequential degradation of the GAGs heparan sulphate (HS) and dermatan sulphate (DS). This deficiency blocks the hydrolysis of these GAGs, leading to storage of these substrates partially degraded in the lysosome and to their excretion in excess in the urine.

MPSI is the most common of the MPS disorders in Caucasians, with an incidence of 1:120,000 live births (Meikle et al., 1999). The disease is systemic and clinically heterogeneous. There are three clinical presentations of the disease that ranges from the very severe Hurler syndrome to the relatively mild Scheie syndrome, and an intermediate form called Hurler-Scheie syndrome (Neufeld and Muenzer, 2001).

Patients affected by the Hurler syndrome are usually diagnosed within the first year of life. They usually die before 10 years of age when untreated. This progressive disease presents clinical symptoms that include corneal clouding, hernia, skeletal malformations, heart disease, organomegaly, fatigue, hydrocephalus, enlarged tongue and mental retardation, only of the most severe form. Patients with Scheie syndrome can have normal lifespan, intelligence and stature. These patients present a more attenuated clinical phenotype, with variable presentation and delayed onset. Hurler–Scheie patients show a broad clinical presentation that lies between the two extremes of Hurler and Scheie (Hartung et al., 2004 ; Domenico et al.; 2005 ; Fuller et al., 2005).

Therapies are available for MPSI, including enzyme replacement (ERT) (Kakkis *et al.*, 1996; Kakkis *et al.*, 2001) and allogeneic bone marrow transplantation (BMT) (Hobbs *et al.*, 1981; Whitley *et al.*, 1993; Peters *et al.* 1996; Peters *et al.*, 1998). BMT can effectively treat somatic tissue and there are some, but limited effect, into the central nervous system (CNS) pathology (Braunlin et al., 2003). For effective treatment of Hurler syndrome patients by BMT, early diagnosis and treatment, before the onset of irreversible pathology, is crucial (Peters *et al.*, 1996; Vellodi *et al.*, 1997). Nevertheless, both the need for HLA-matched donors and the low amount of the enzyme that can be administered to the organism become its usefulness limited.

Enzyme replacement therapy consists in the intravenous infusion of the enzyme, which is not effective in accessing sites of brain pathology, due to the blood–brain barrier. Thus, it is currently limited to the treatment of patients without CNS damage (Kakkis et al.,2001; Laronidase, 2002).

Studies on ERT started *in vitro* (Fratantoni *et al.*, 1969; Sando and Neufeld, 1977), following with animal models (Shull *et al.*, 1994; Kakkis *et al.*, 1996, 2001b), which proved effective but with immunological problems, and finally led to clinical trials of recombinant IDUA (rhIDUA) in humans (Kakkis *et al.*, 2001a; Wraith, 2001). The latter studies showed limited benefits, with reduction in lysosomal storage in the liver. Moreover, the high cost of the therapy and the need for weekly intravenous injections limit its usefulness (Kakkis *et al.*, 2001a).

MPS I has been considered a good candidate for gene therapy. Even minimum amounts of IDUA can be taken up by receptor-mediated endocytosis through the mannose 6-phosphate marker (Kaplan *et al.*, 1977) and are able to correct the pathology.

Since MPSI pathology is not confined to the CNS, alleviation of widespread disease would require systemic treatment allied to *in situ* treatment into the brain (Stein et al.,1999).

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) has become an attractive vector for gene transfer into the central nervous system (CNS) due to its lack of toxicity and absence of inflammatory response. Improvements in rAAV vector technology have allowed high-titer, high-purity vectors that are free of wild-type AAV and adenovirus to be produced. These aspects, combined with the ability of rAAV to stably transduce a wide variety of neuronal cell types in many brain areas, have facilitated phenotypic correction in many rodent disease models (Fitzsimons et al.,2002).

In the present study we analyzed the murine model of MPSI to test therapy based on intrastriatal delivery of the AAV2.5-IDUA vector.

## EXPERIMENTAL METHODS

### *Antibodies and reagents*

The following antibodies were used (dilutions are for immunofluorescence only): mouse monoclonal IgG1 anti-GM130 (1:200, BD Biosciences), rat monoclonal IgG2b anti-LAMP1 (clone 1D4B, 1:500, BD Biosciences), mouse monoclonal IgG1 anti-MAP2ab (clone AP20, 1:1000, Sigma), mouse monoclonal IgG1 anti-NF200 (RT97) (1:1000, BD Biosciences), mouse monoclonal IgG1 anti-calbindin (1:1000, BD Biosciences), rabbit polyclonal Ig anti-GFAP (1:500, BD Biosciences). Appropriate secondary antibodies conjugated to Alexafluor® 488, 555 or 647 were from Invitrogen. Nuclei were stained with Hoechst 33342.

### *Mouse experiments*

Mouse experiments were approved by the appropriated ethical committee for animal research. C57Bl/6<sup>IDUA<sup>+/-</sup></sup> heterozygote mice (from Pr. E. Neufeld, UCLA, Los Angeles, CA) (Zheng *et al.*, 2003) were mated and their progeny was genotyped by PCR on DNA from tail-clipped. Mice, wild type or C57Bl/6<sup>IDUA<sup>-/-</sup></sup> MPSI, were euthanized with a lethal injection of ketamine before intracardiac perfusion with PBS or PBS plus fixative. We analyzed three mice in each group: wild type control; knockout control; and knockout treated.

### *Viral vectors*

Adeno-associated virus vector structure, production and stereotactic injections in mouse brain were previously described (Ausseil *et al.*, 2008). The AAV2.5-hIDUA vector is a hybrid AAV vector in which the capsid is from the AAV5 serotype and the genome from the AAV2 serotype. The vector genome contains the Inverted Terminal Repeats (ITRs) of AAV2, the mouse phosphoglycerate kinase-1 gene promoter (mPGK), the human IDUA cDNA, the bGH polyadenylation sequence and the enhancer WPRE. Vector batches were produced in HEK293 cells and vector genome (vg) concentration in batches was quantified by dot blot. Six-week-old C57Bl/6<sup>IDUA<sup>-/-</sup></sup> MPSI mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1/0.01 mg

per gram of body weight) and installed on a stereotactic frame. Animals received a single 5 µl injection of  $3 \times 10^9$  vg in both striatum.

#### *IDUA enzymatic assay*

All tissue and plasma enzyme analyses were carried out essentially as described (Hartung *et al.*, 2004). Before the sacrifice, 16 weeks after treatment, whole heparinized blood was collected by retroorbital eye bleeds and centrifuged to obtain plasma. Tissue samples for enzyme analyses were suspended in approximately 100 µL of enzyme water. Crude protein extracts were prepared from tissues by three cycles of freeze – thaw using a liquid nitrogen and 37 °C water bath. Each tissue was processed with a separate set of surgical tools and all negative controls were processed in a separate fume hood to minimize intertissue and interanimal contamination.

Lysates were cleared by centrifugation at 12,000g for 10 min at 4 °C. Replicate aliquots of plasma or cleared lysate were incubated in a solution containing 2.85 mM fluorogenic substrate, 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduronide (Calbiochem, San Diego, CA, USA), in a 0.2 M sodium formate – 0.02% Triton X buffer (pH 3.3). Sample and substrate were incubated overnight (18h) at room temperature before the reaction was stopped by addition of 5 ml of 0.5 M glycine buffer, pH 11. Fluorescence emission was measured at 570/600 nm using a Wallac2 Victor fluorimeter. One activity unit corresponds to the hydrolysis of 1 nmol of substrate per hour and is expressed per mg of protein in extracts. All statistical analyses were conducted using ANOVA, with Fisher's least significant difference algorithm as a determination of significance ( $P < 0.05$ ) between groups.

#### *Immunohistochemistry*

After intracardiac perfusion with PBS followed by PBS-4% paraformaldehyde (50 ml), mouse brains were removed and post-fixed in the same fixative for 1 hour at 4°C. Brains were then embedded in 20% gelatin and cut sagittally with vibratome (75 µm thick sections). Sections were delipidated for 3 minutes with pure ethanol, rinsed 3 times in PBS before overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in PBS-0.3% triton X100-1% BSA-2% normal goat serum. Bound antibodies

were revealed by one-hour incubation at room temperature with fluorescent secondary antibodies. Coverslips were mounted in FluoromountG®.

### *Imaging*

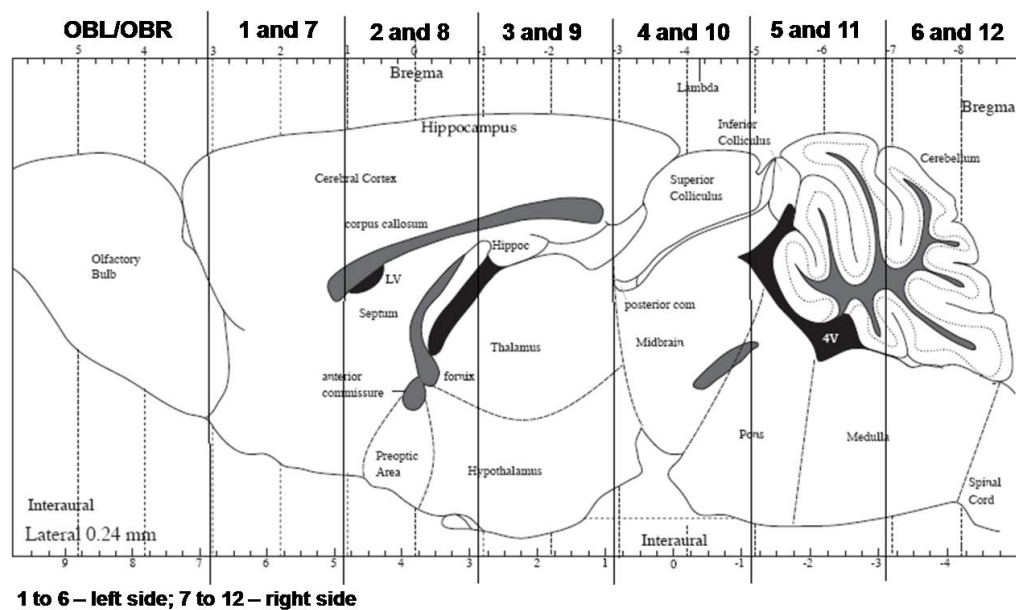
Images of immunolabeled brain sections or cells were observed and acquired with either Axioplan 2 imaging optic microscope equipped with Apotome and AxioCam TR camera and controlled by the AxioVision software (Zeiss), or with a SP5 confocal system (Leica). Whatever the phenotype and/or treatment, time exposure was determined and then kept constant for all markers revealed in the same experiment. Colocalisation coefficients were determined with the Axiovision colocalisation module in manually delineated cell soma.

## RESULTS

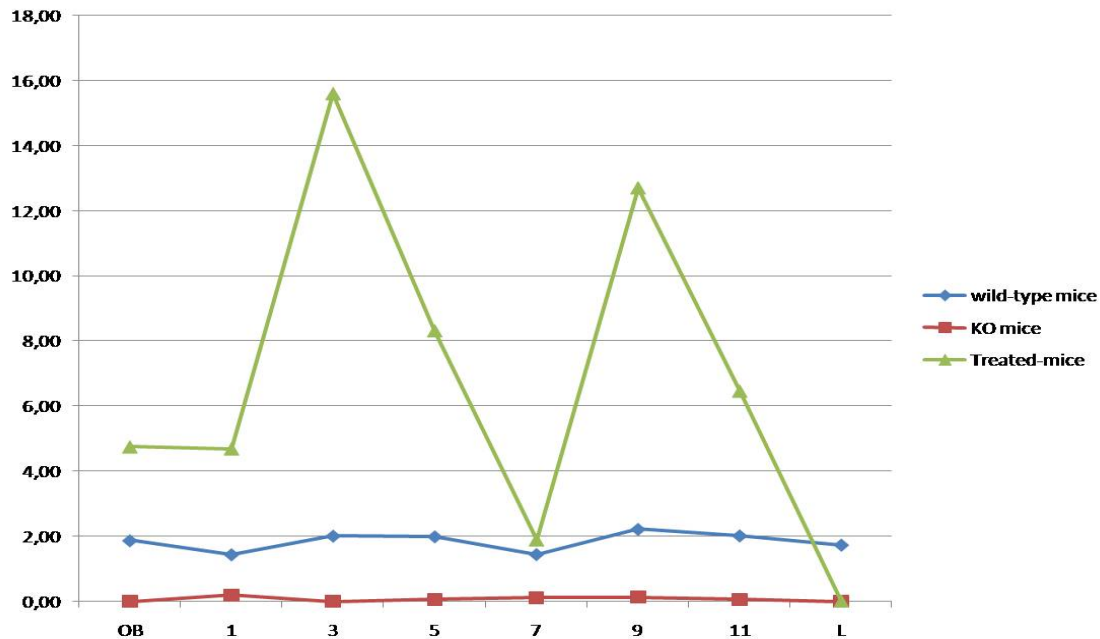
Six 6-week-old MPS I mice received a bilateral stereotactic injection of the AAV2.5-hIDUA in the striatum. Animals were killed 16 weeks after treatment. IDUA activity was measured in brain extracts and plasma.

### *IDUA activity*

To further document enzyme spreading in the brain, we measured IDUA activity in each one of the seven coronal slices 2mm-thick (figure 1). We could detect IDUA activity in all slices of treated mice brain, showing that the AAV2.5 vector can successfully and robustly spread for the whole mouse brain or that an efficacious cross-correction process has occurred and IDUA has a great spread over long distance in the CNS. However, this widespread was not equal for all brain slices, with the medial cortex and the cerebellum showing peaks of enzymatic activity. As already reported, we observed a global overexpression of IDUA activity in the treated mice (Desmaris et al., 2004; Watson et al., 2006). On an average, the activity in the treated mice was 3.5-fold higher than in the wild-type and 49.4-fold higher than the KO mice. Figure 2 depicts the mean IDUA activity in each slice of the left brain of the three analyzed phenotypes, wild-type, KO and treated mice. The right side showed similar results (data not shown).



**Figure 1 – Brain division for IDUA activity measure.** OBL- olfactory bulb left; OBR- olfactory bulb right; **1 and 7** – pre-frontal cortex; **2 and 8** – rostral cortex; **3 and 9** – medial cortex; **4 and 10** – caudal cortex; **5 and 11** – frontal cerebellum; **6 and 12** – caudal cerebellum. Each slice was 2 mm-thick.



**Figure 2 – IDUA activity in the left brain portions (see figure 1) and in the liver (L) of wild-type, KO and treated mice.** Note the IDUA overexpression in treated mice and the peaks in the medial cortex (3) and cerebellum (9 and 11). Right brain shows similar results (data not shown).

## *Immunohistochemistry*

### Qualitative characterization of MPSI SNC pathology

We qualitatively described the SNC pathology in the MPSI mouse model. We observed a general and massive storage of LAMP1+ vesicles associated with an astrogliosis in the brain as a whole (figure 6). As depicted in the Figure 3, we observed storage and clustering of LAMP1+ vesicles in the cortex and in the hypothalamus of MPSI mice. Always, there are no colocalization of LAMP1+ vesicles and GM130. Confirming that they are really lysosomal vesicles and that LAMP1+ signal was not in the golgien vesicles. Otherwise, we can see colocalization with Map2, a dentrite marker, showing that LAMP1+ vesicles storage in this place. Moreover, as shown in figure 5, LAMP1+ vesicles storage in the Purkinje cells in the cerebellum.

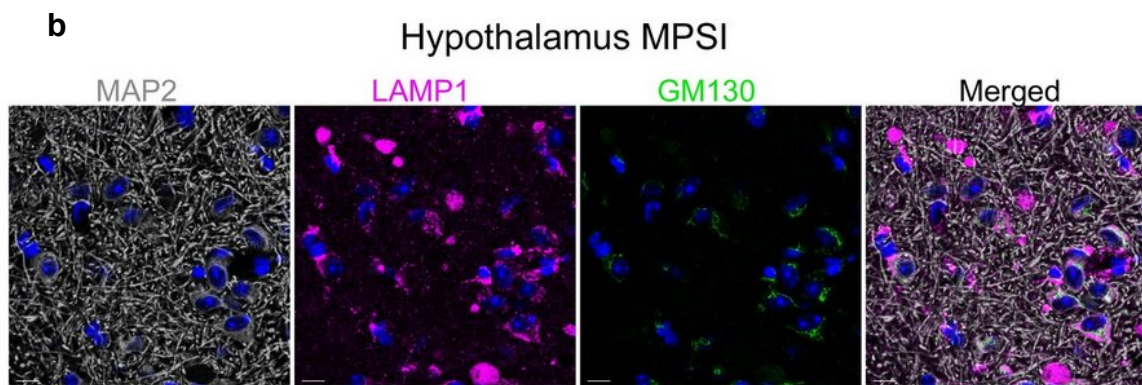
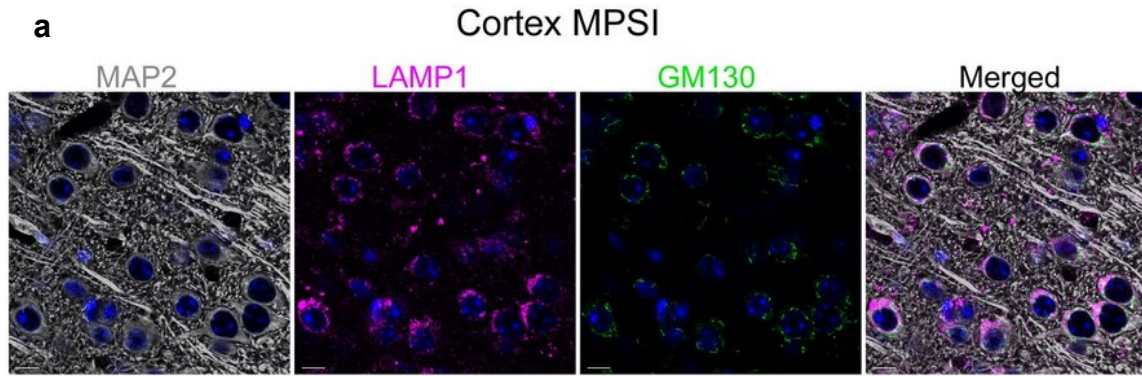
We could also observe the presence of vesicles positives for LAMP1 and NF200, in the cerebellum and in the spinal cord (figure 4). The NF200 is an axonal marker. In the literature, the colocalization of LAMP1 and NF200 is described as a criterium to define a spheroid. Spheroids are characteristics of several neurodegenerative diseases as Alzheimer and Parkinson disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis (Wirhth *et al.*, 2007; van Gerpen *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2008).

### Reversing or prevention of CNS pathology

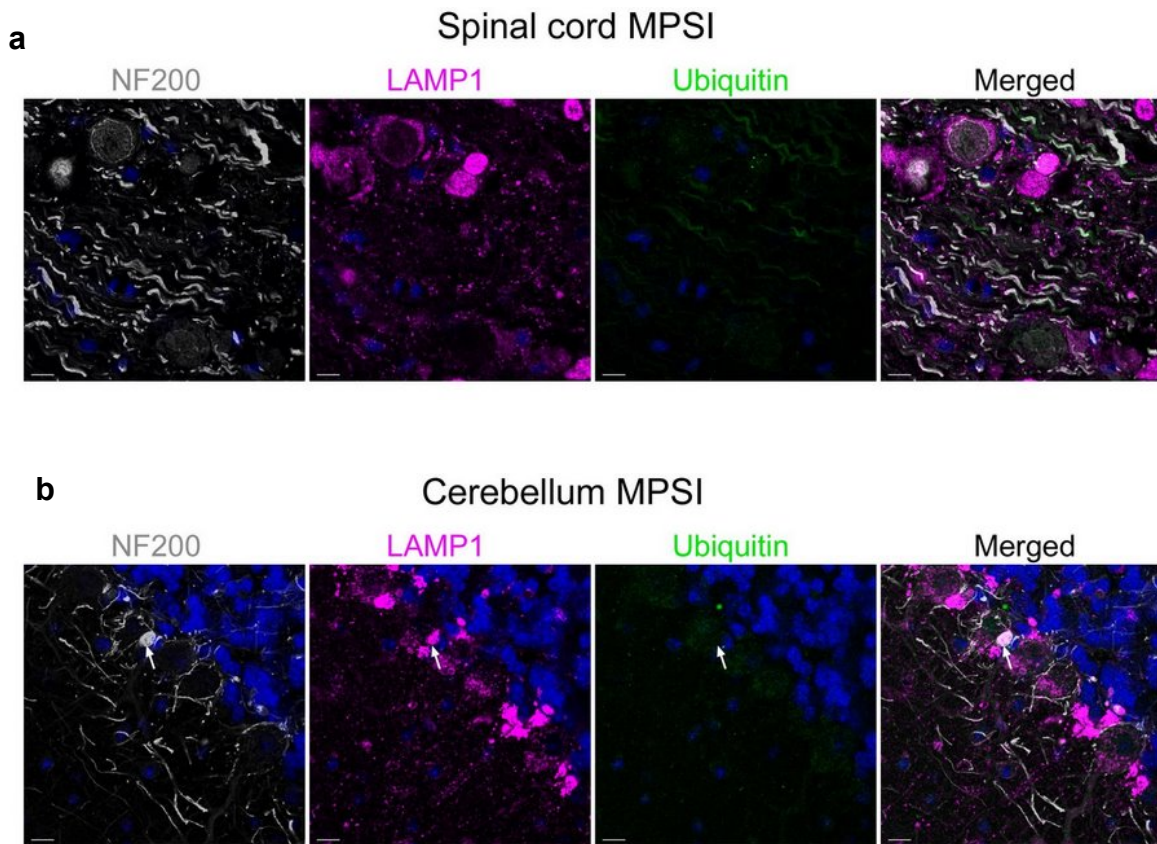
Our results shows that bilateral intrastriatal injection globally and efficiently corrects or prevents the astrogliosis and the LAMP1+vesicles storage scenario in cortex (figure 6).

In cerebellum, some LAMP1+ vesicles are massively stored in dendrites of Purkinje cells and gene transfer seems to partially correct the LAMP1+ vesicles storage (figure 7). The persistent lesions were much less severe than in untreated MPSI mice at the same age.

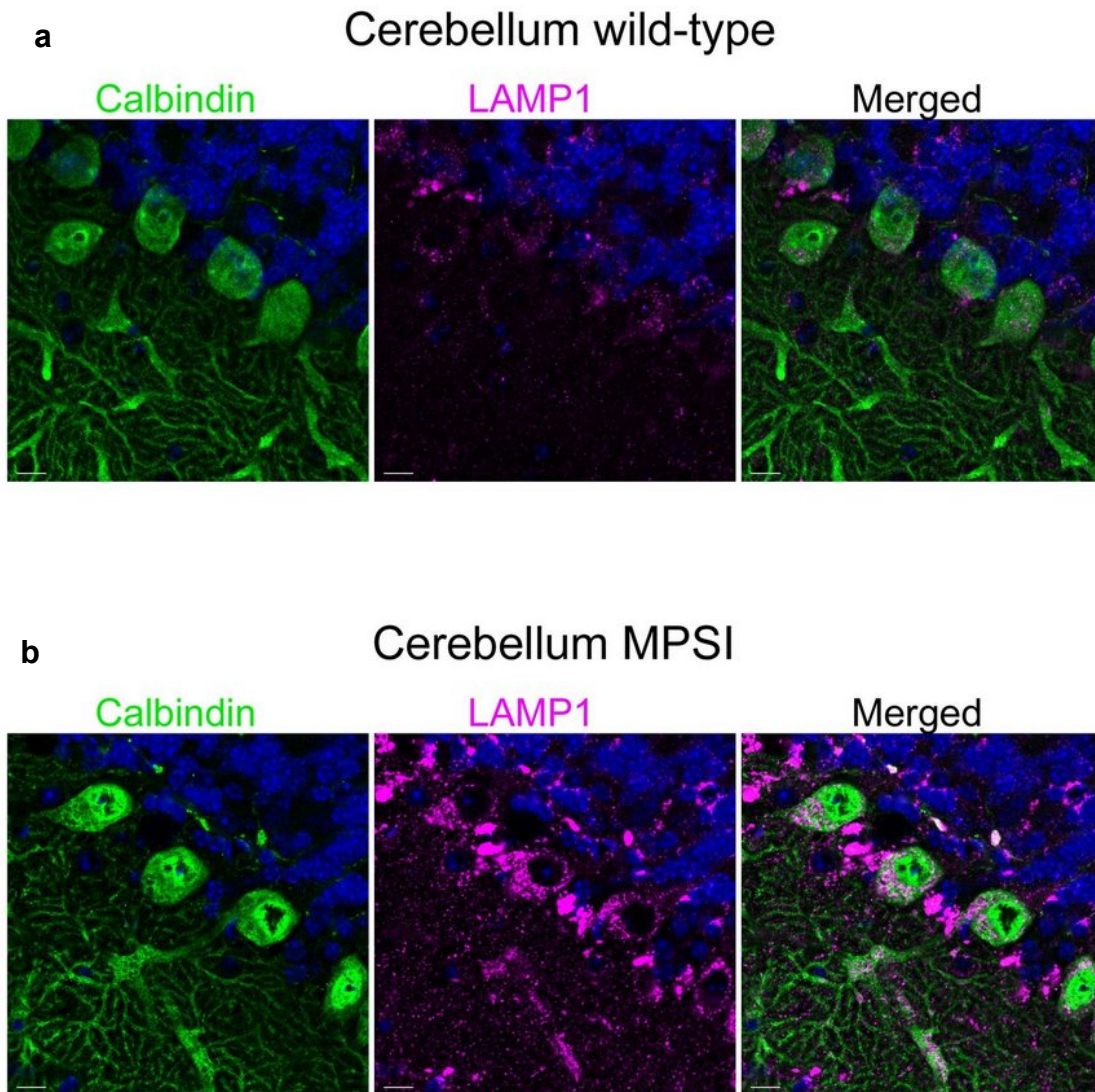




**Figure 3 - MPSI mice cortex (a) and hypothalamus (b), marked with MAP2 (dendrite marker), GM130 (Cis-Golgi marker) and LAMP-1 (lysosome marker). Note the storage and clustering of LAMP-1+ vesicles. This storage was colocalized with Map2 in the cortex, but not with GM130 either in the cortex or in the hypothalamus. Images made in a sp5 confocal system. Scale: 10  $\mu$ m**

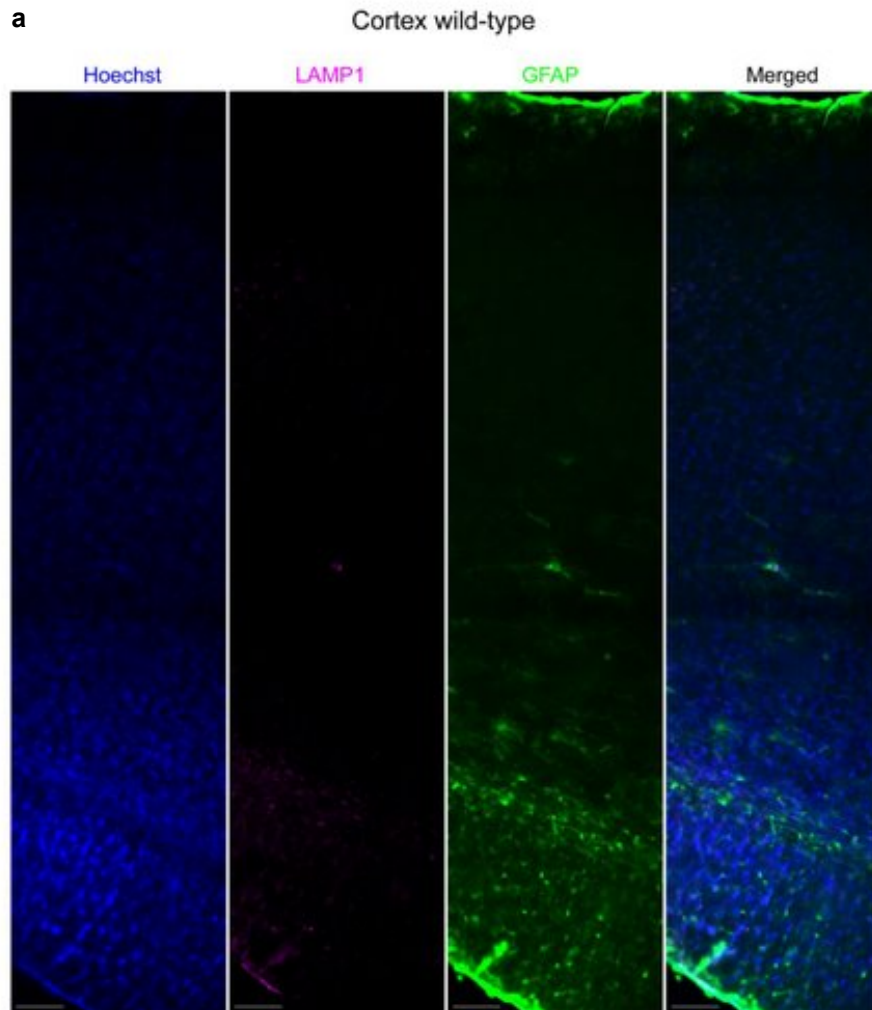


**Figure 4 – MPS I mice spinal cord (a) and cerebellum (b), marked with NF200 (axon marker), ubiquitin and LAMP 1.** (a): we can observe storage and clustering of LAMP1+ vesicles. Some of them are also positives for NF200, what characterizes spheroids, described in several neurodegenerative diseases as Alzheimer and Parkinson disease, and Amyotrophic lateral sclerosis. (b): in the cerebellum, we can also see LAMP1+ distended vesicles equally positives for NF200 (arrows). Images made in a sp5 confocal system. Scale: 10  $\mu$ m.



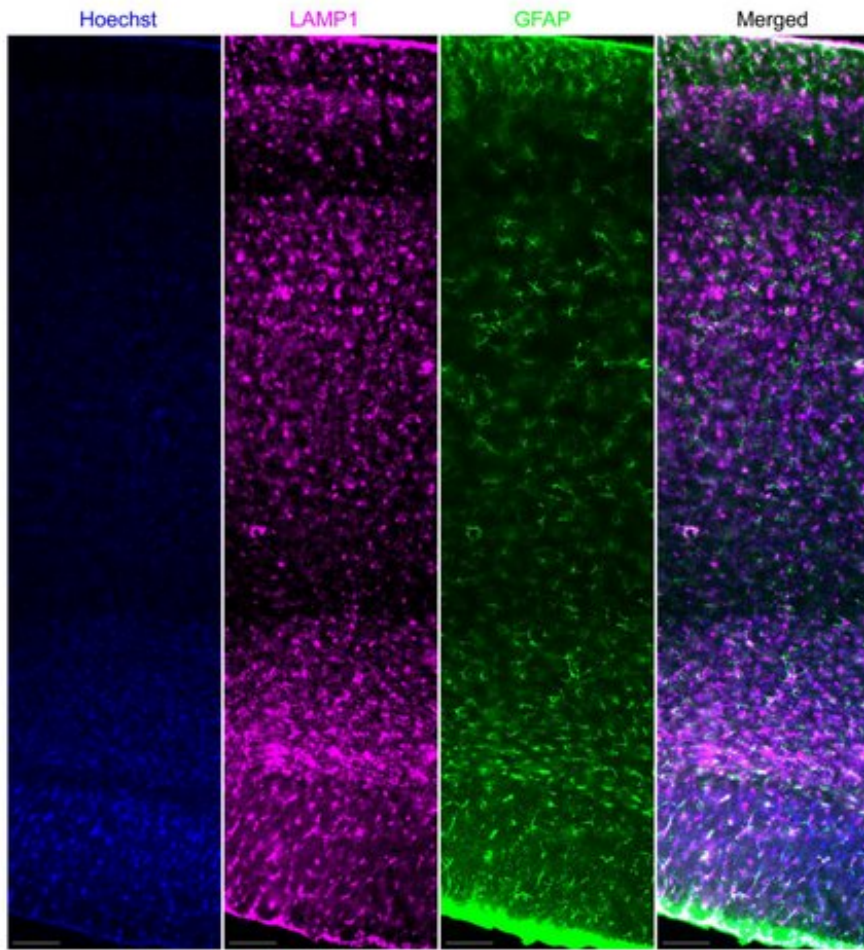
**Figure 5 - Cerebellum of wild-type and MPSI mice marked with calbindin (purkinje cells marker) and LAMP1. Note the storage of LAMP1+ vesicles in the purkinje cells of MPSI mice. Images made in a sp5 confocal system. Scale: 10  $\mu$ m.**

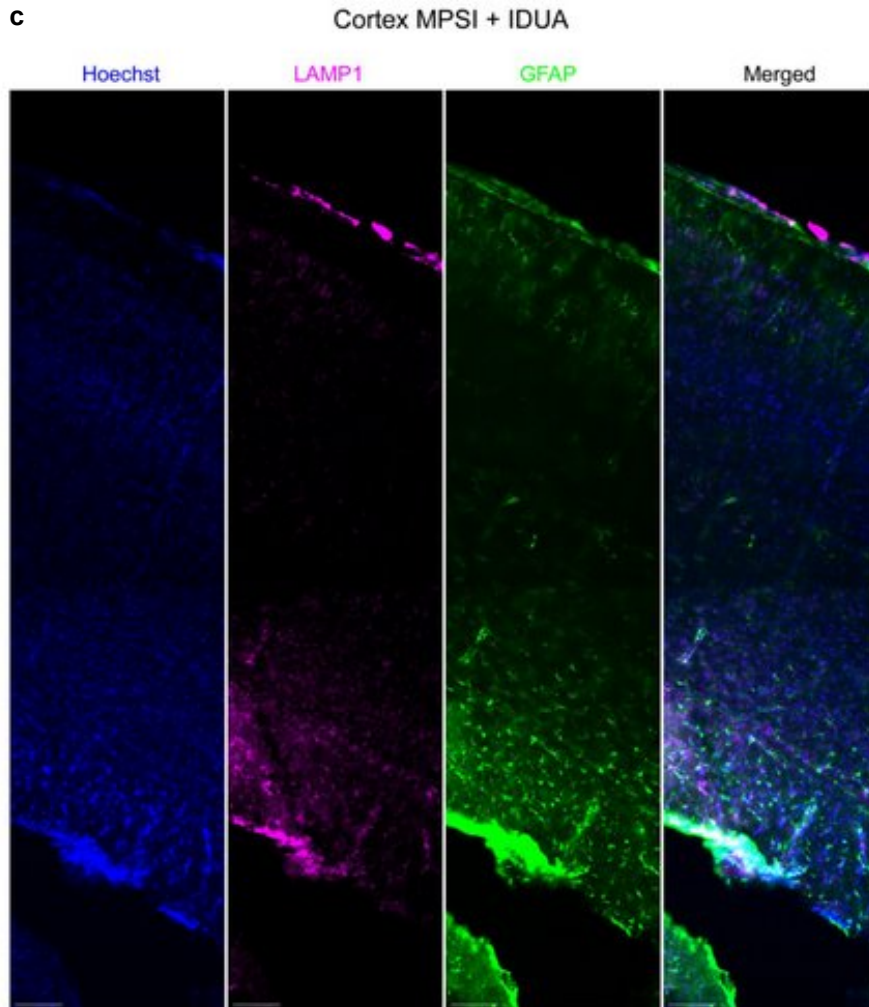




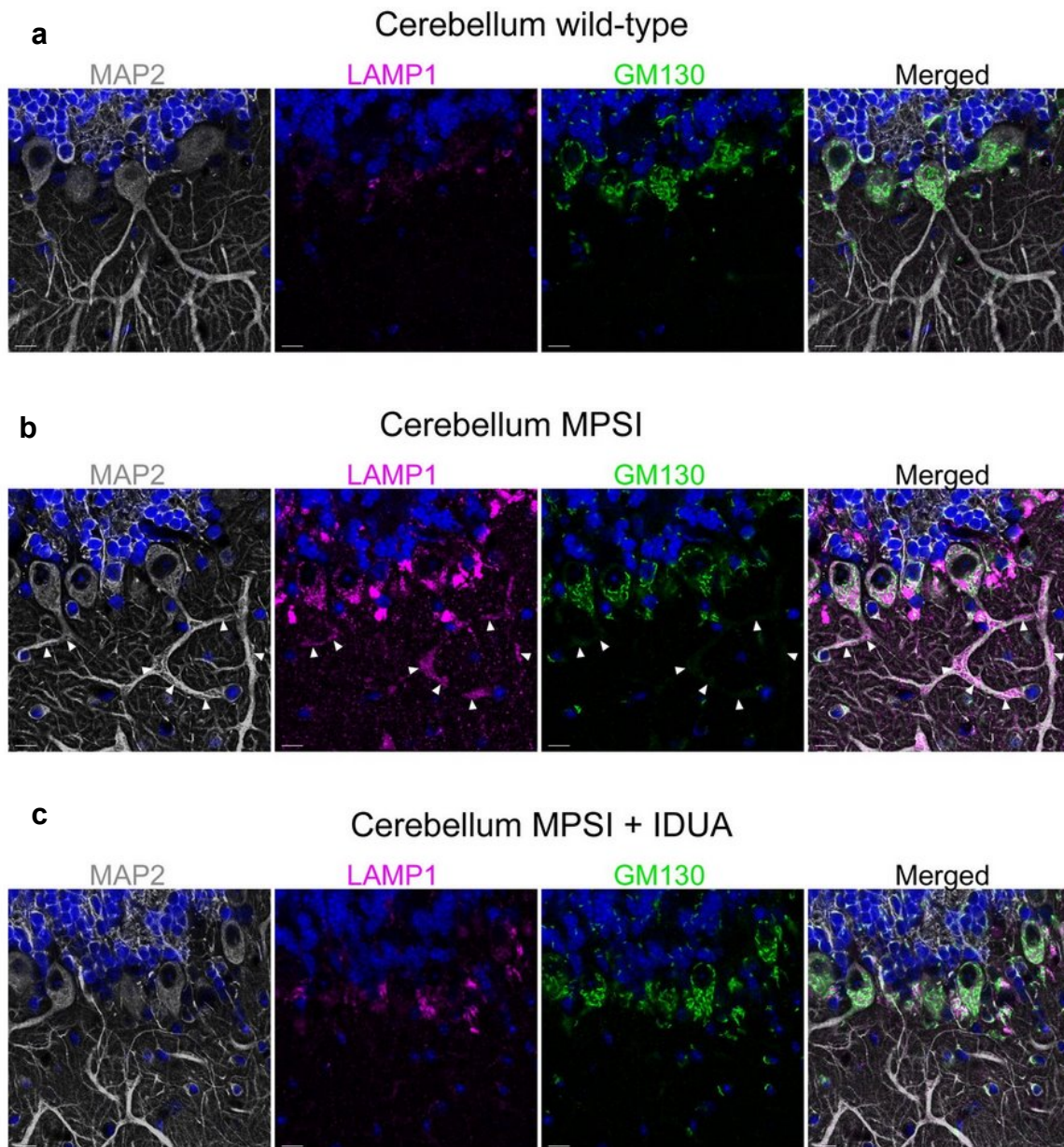
**b**

Cortex MPSI





**Figure 6 - Images of the cortex marked with LAMP-1 (lysosome marker) and GFAP (astrocyte marker).** (a): cortex of a wild-type mice showing a normal phenotype; (b): cortex of a MPS I mice (knockout), depicting a scenario of LAMP-1 vesicles storage and astrogliosis; (c): cortex of a MPS I mice treated by AAV2.5-IDUA intrastriatal bilateral injection, showing a picture most similar to the wild phenotype than to the disease one. This suggest that the gene transfer may correct (or prevent) the storage as well as the astrogliosis. Images were made by classic epifluorescence microscopy. Scale: 100 $\mu$ m



**Figure 7 – Cerebellum of wild-type (a), MPSI (b) and MPSI treated (c) mice, GM130 and LAMP1.** Some LAMP1+ vesicles are massively stored in dendrites of Purkinje cells (head of arrow) of MPSI mice. There are not colocalizations with GM130. Gene transfer seems to partially correct the LAMP1+ vesicles storage (c). Images made in a sp5 confocal system. Scale: 10  $\mu$ m.



## DISCUSSION

The mucopolysaccharidoses are lysosomal storage disorders. The accumulation of undegraded glycosaminoglycans within the lysosomes is the primary cause of the disease. However, it has been suggested that the various ranges of clinical symptoms also activate secondary pathways, such as cellular dysfunction, because of the altered activation of biochemical pathways and altered gene expression. Overall, these altered primary and secondary pathways cause tissue pathology and general organ damage (Futerman et al., 2004).

MPSs are good candidates for treatment through complementation approaches. This prediction comes from an original observation of Fratantoni and collaborators. They were able to cross-correct MPSI and MPSII defects in vitro, by co-cultivating normal and affected fibroblasts leading to an intercellular metabolic complementation (Fratantoni et al., 1968).

The currently therapeutic options for MPSI are ERT, cellular therapies, such as BMT, and virus-mediated gene therapy. To deliver an IDUA gene to the brain in MPSI mice, we chose an AAV-2.5-hIDUA vector. This vector is a hybrid AAV vector in which the capsid is from the AAV-5 serotype and the genome from the AAV-2 serotype. AAV-2 based vectors were known to transduce neurons and to have the potential of a long-term expression after a single dose. However, Desmaris et al. (2004) showed that AAV-5 rather than an AAV-2 vector results in a broader distribution of IDUA in the brain.

Transduced cells overproduce IDUA that should be secreted in enough amounts to be provided to non-transduced cells via cross-correction. And then correct or prevent neuropathology.

This study in adult MPSI mice contributes to the evaluation of the feasibility of gene therapy targeted to the CNS in children with Hurler syndrome. AAV2.5 vectors coding for hIDUA were injected bilaterally in the adult MPSI mouse striatum, creating an intracerebral source of the therapeutic enzyme. Results provide evidence that IDUA could spread from a single source to almost the entire mouse brain. They show that CNS pathology can be prevented or even corrected in a mouse model of a disorder that represents a credible target for human application.



Neuropathology associated with MPSI is not focal. Candidate therapeutic methods must achieve IDUA delivery to the entire CNS. We document widespread IDUA delivery and sustained disease correction in almost the entire adult MPSI mouse brain after a bilateral injection of AAV2.5 vector. Similar results have been reported previously with vector other vectors systems (Desmaris et al., 2004).

Moreover, we have confirmed that MPSI is a more caudal disease, in contrast with the majority of neurodegenerative disorders (ND) that are a major endanger of the rostral cortex. MPSI (Hurler syndrome) is a caudal neurodegenerative disorder, with a major endanger of the cerebellum and the spinal cord. On the other hand, as in others NDs, MPSI seems to also shows spheroids. This could be seen either in cerebellum or in spinal cord (figure 4). Desmaris et al. (2004) have demonstrated that the proportion of affected cells and the severity of lesions increased with age in the MPSI mouse model. Lesions in neurons and astrocytes, as well as in the cerebellum became apparent at late time points. They also reported a loss of Purkinje cells in aged MPSI mice.

Finally, we are firstly described the presence of axonal spheroids in the MPSI mouse model. Axonal spheroids are characteristic founds of several neurodegenerative disorders (Wirhth et al., 2007; van Gerpen et al., 2008; Gregory et al., 2008). This found can give new insights into MPSI physiopathological mechanisms. The involvement of phospholipase (A2) pathway may be a possible explanation for the presence of these spheroids in MPSI mice, as described for other neurodegenerative diseases (Gregory et al., 2008).

## CONCLUSION

This study provides more evidences that neuropathology associated with MPSI could be efficiently prevented through AAV2.5 vector-mediated gene therapy targeted to the brain. Probably a single AAV vector injection would not be sufficient to deliver IDUA to the entire brain of a child. Moreover, safety considerations also require long-term investigations in large animal models with the aim to demonstrate clinical benefit in the absence of severe adverse effects. This study has also contributed to better understand the brain pathology in MPSI.

## BIBLIOGRAPHY

- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281:249-254.
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. Edition (C.R. Scriver ALB, W. S. Sly, D. Valle, ed), pp 3421-3452. New York: McGraw-Hill.
- Hartung SD, Frandsen JL, Pan D, Koniar BL, Graupman P, Gunther R, Low WC, Whitley CB and Mclvor RS (2004) Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human alpha-L-iduronidase gene. *Mol Ther* 9:866-875.
- Di Domenico C, Villani GRD, Di Napoli D, Gonzalez y Reyero E, Lombardo A, Naldini L and Di Natale P (2005) Gene Therapy for a Mucopolysaccharidosis Type I Murine Model with Lentiviral-IDUA Vector. *Hum Gene Ther* 16:81-90.
- Fuller M, Brooks DA, Evangelista M, Hein LK, Hopwood JJ and Meikle PJ (2005) Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. *Mol Genet Metab* 84:18-24.
- Kakkis ED, McEntee MF, Schmidtchen A, Neufeld EF, Ward DA, Gompf RE, Kania S, Bedolla C, Chien SL, Shull RM (1996) Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem Mol Med* 58:156-167.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF (2001a) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 344:182-188.
- Kakkis ED, Schuchman E, He X, Wan Q, Kania S, Wiemelt S, Hasson CW, O'Malley T, Weil MA, Aguirre GA, Brown DE, Haskins ME (2001b) Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 72:199-208.
- Hobbs, J. R., et al. (1981). Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 2: 709 – 712.
- Whitley, C. B., et al. (1993). Long-term outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am. J. Med. Genet.* 46: 209 – 218.
- Peters C, Balthazor M, Shapiro EG, King RJ, Kollman C, Hegland JD, Henslee-Downey J, Trigg ME, Cowan MJ, Sanders J, Bunin N, Weinstein H, Lenarsky C, Falk P, Harris R, Bowen T, Williams TE, Grayson GH, Warkentin P, Sender L, Cool VA, Crittenden M, Packman S, Kaplan P, Lockman LA, et al. (1996) Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood* 87:4894-4902.

- Peters C, Shapiro EG, Krivit W (1998) Neuropsychological development in children with Hurler syndrome following hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2:250-253.
- Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ and Krivit W (2003) Usefulness of bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. *Am J Cardiol* 92:882-886.
- Vellodi A, Young EP, Cooper A, Wraith JE, Winchester B, Meaney C, Ramaswami U and Will A (1997) Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Arch Dis Child* 76:92-99.
- Laronidase, *BioDrugs* 16 (2002) 316–318 (Review).
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1969) The defect in Hurler and Hunter syndromes. II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:360-366.
- Sando GN, Neufeld EF (1977) Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme, alpha-l-iduronidase, by cultured human fibroblasts. *Cell* 12:619-627.
- Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ and Neufeld EF (1994) Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12937-12941.
- Wraith JE (2001) Advances in the treatment of lysosomal storage disease. *Dev Med Child Neurol* 43:639-646.
- Kaplan A, Achord DT and SLY WS (1977) Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 2026–2030.
- Stein CS, Ghodsi A, Derksen T, Davidson BL (1999) Systemic and central nervous system correction of lysosomal storage in mucopolysaccharidosis type VII mice. *J Virol* 73:3424-3429.
- Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ (2002) Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods* 28:227-236.
- Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, Parent M, Cheillan D, Fuller M, Maire I, Vanier M-T, Heard J-M (2008) Early Neurodegeneration Progresses Independently of Microglial Activation by Heparan Sulfate in the Brain of Mucopolysaccharidosis IIIB Mice. *Plos one* 3(5):e2296.
- Desmaris N, Verot L, Puech JP, Caillaud C, Vanier MT and Heard JM (2004) Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol* 56:68-76.

- Watson G, Bastacky J, Belichenko P, Buddhikot M, Jungles S, Vellard M, Mobley WC and Kakkis E (2006) Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPSI mice. *Gene Therapy* 1-9.
- Futerman, A.H. and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 5: 554–565.
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1968) Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* 162:570-572.

**CAPITULO III**  
**- TERAPIA CELULAR-**

**IV. EFFECT OF ADMINISTRATION ROUTE ON THE  
BIODISTRIBUTION OF EGFP+ MURINE MESENCHYMAL  
STEM CELLS IN C57BL/6 NORMAL MICE - A QUALITATIVE  
ANALYSIS.**

***ARTIGO SUBMETIDO AO INTERNATIONAL JOURNAL OF  
BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY***

## **Effect of Administration Route on the Biodistribution of eGFP+ Murine Mesenchymal Stem Cells in C57Bl/6 Normal Mice - a qualitative analysis.**

Renata S Coura<sup>1</sup>, Pedro Cesar Chagastelles<sup>1</sup>, Marilda C Fernandes<sup>2</sup>, Francele V Piazza<sup>2</sup>, Guilherme V Pinto<sup>2</sup>, Suélen Merlo<sup>2</sup>, Rosalva Meurer<sup>2</sup>, Nance B Nardi<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Patologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

§Corresponding author

Email addresses:

RSC: [rscoura@yahoo.com](mailto:rscoura@yahoo.com)

PCC: [pedro\\_chagastelles@yahoo.com](mailto:pedro_chagastelles@yahoo.com)

MCF: [marneuro@ffcmpa.edu.br](mailto:marneuro@ffcmpa.edu.br)

FVP: [francele\\_valente@hotmail.com](mailto:francele_valente@hotmail.com)

GVP: [gvanik@gmail.com](mailto:gvanik@gmail.com)

SM: [suelenm@gmail.com](mailto:suelenm@gmail.com)

RM: [rose@ffcmpa.edu.br](mailto:rose@ffcmpa.edu.br)

NBN: [nardi@ufrgs.br](mailto:nardi@ufrgs.br)

## **Abstract**

### *Background*

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent adult stem cells able to differentiate along different mesenchymal lineages, currently considered one of the best candidates for cell and gene-based therapeutic approaches by both local and systemic application. In this study we evaluated the biodistribution pattern of MSCs isolated from eGFP C57Bl/6 transgenic mice and injected through five different routes into normal adult C57Bl/6 normal mice. The routes of injection were: intravenous (IV- tail vein), intraperitoneal (IP), intranasal (IN), intra-carotid (IC) and intraventricular cerebral (IVC). Volume and concentration of cells were adjusted for each route. Mice were sacrificed around 30 or 80 days after injection and the organs were analyzed by PCR, fluorescence microscopy and immunohistochemistry.

### *Results*

PCR results showed that the IVC and IP routes resulted in a similar biodistribution pattern of MSCs, under our conditions. The IC and IN routes are not adequate for the administration of these cells, probably due to their size. IV injection results in a more restricted biodistribution pattern. Positive cells were not observed by fluorescence microscopy, and few eGFP<sup>+</sup> cells were observed in immunohistochemistry analyses.

### *Conclusions*

We suggest that the IP route may be considered an adequate alternative for MSC-based cellular therapy of wide spectrum, since it results in a wide biodistribution, including the brain, and constitutes one of the safest and less invasive routes of cell administration.

## **Background**

The existence of non-hematopoietic stem cells in bone marrow has been suspected for several years. However, their isolation and differentiation potential were first described by Friedenstein *et al.* (1). In recent years, a large number of authors have characterized a specific type of non-hematopoietic stem cells, the marrow stromal cells, which have received different names including mesenchymal stem cells (MSCs), bone marrow fibroblasts and skeletal stem cells (2). Currently, MSCs are relatively well characterized, and have already been isolated from virtually all organs and tissues in different species (3-10). This broad distribution of MSCs, allied to their intrinsic biological features, suggests a likely role of these cells in organ homeostasis, as well as in the maintenance and repair within each tissue (11)



The unique attributes of plasticity, accessibility and homing of MSCs (11-13) have attracted much attention, and their therapeutic potential for different pathologies, including neurodegenerative disorders, is under intense investigation (14, 15). The main approaches under study include local implantation for localized diseases (16-18), systemic transplantation (19-21), combined stem cell and gene therapy (22-24), and the use of MSCs in tissue engineering protocols (25, 26).

The knowledge of the biodistribution pattern of stem cells after infusion into the organism is of great importance for the design of safe and efficient pre-clinical and clinical protocols. Different types of pathologies may require specific routes of administration, resulting in different homing patterns. In the context of organ-specific diseases, as heart and liver disorders, *in situ* administration can be the most adequate (27), whereas systemic routes, particularly intravenous and intraperitoneal, may be more interesting in many other situations (28-31). We have recently compared *in situ* and systemic delivery of bone marrow and mesenchymal stem cells in a spontaneously hypertensive rat model of acute myocardial infarction, showing that the most efficient route may also depend on the cell type used in the therapy protocol (21, 32). Reaching the brain still constitutes a barrier to the successful therapy of neurological disorders and other conditions with central nervous system manifestations (33).

In spite of the importance of knowing the biodistribution pattern of MSCs with different routes of administration, the subject is not yet well explored, leaving gaps to be filled (34). In the present study we established the qualitative pattern of biodistribution of murine MSCs administered through different routes, in normal adult C57Bl/6 mice, in order to determine the most adequate and efficient route for different therapeutic approaches.

## **Results**

### *Mesenchymal stem cells characterization*

Mesenchymal stem cells isolated from the bone marrow of eGFP mice showed typical culture kinetics and differentiated into adipocytes and osteoblasts when properly stimulated (Fig. 1). Immunophenotyping of the cultures showed that the

cells were positive for CD29 and CD44 and negative for CD11b, CD31 and CD45 (data not shown).

#### *IVC and IP MSC infusion resulted in the widest biodistribution pattern*

Two experimental essays were carried out. Experiment 1 consisted of two groups, one transplanted intraperitoneally (IP) and another by the left brain ventricle (IVC) (table 1), whose animals had been sacrificed, without perfusion, 30-34 days after the transplantation. Experiment 2 was comprised of 4 groups. One injected IP; one, intravenously (IV); one, intranasal (IN); and another intracarotid (IC). These animals were sacrificed by perfusion 80-84 days after transplantation.

PCR showed that all organs from IVC or IP-injected mice were positive for eGFP cells in at least one animal of the group (Tables 2 and 3). In experiment 1, as animals were not perfused, blood was also analyzed to control for possible false-positive results due to the presence of eGFP-positive cells in the blood. However, blood from all animals was negative for eGFP. In both experiments, fluorescent cells were not observed by flow cytometry and only scarce cells could be seen by IHC in tissues that were positive by PCR (not shown).

Only brain, lung, liver and kidney from IV-injected mice were positive for eGFP in at least one animal. No positive results were observed in any of the animals transplanted through IN or IC injection.

Although a large individual variation has been observed in all groups of both experiments, the general qualitative pattern of biodistribution of eGFP-positive MSCs, as shown by PCR and presented in Fig. 2, was established. IVC and IP administration of the cells resulted in the widest biodistribution pattern, and all organs were positive for the eGFP gene. The IV route showed a more restricted biodistribution, while no eGFP-positive samples were observed in animals treated by the IC and IN routes. All samples were positive for GAPDH (not shown).

#### *MSCs are able to cross the blood-brain barrier in both directions*

IVC-infused mice showed eGFP-positive cells in brain as well as in all other organs analyzed (brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, bone marrow and spinal cord). In the same way, systemically infused mice, either by IP or IV routes, showed all organs, including the brain, positive for eGFP cells. These results suggest a MSC capacity to cross blood-brain barrier in both directions.

## Discussion

In this paper, we originally evaluated the qualitative biodistribution pattern of eGFP+ MSCs administered through different routes into C57Bl/6 normal mice, in order to determine the more adequate and efficient administration route for each therapeutic approach. Intraventricular cerebral (IVC) and intraperitoneal (IP) routes resulted in the widest biodistribution pattern, not differing among them. According to PCR analysis, all organs were positive in at least one animal of each group (IVC or IP).

The IV route showed a more restricted biodistribution pattern and only the brain, lung, liver and kidney were positive in this group. On the other hand, no eGFP-positive cells could be found in mice injected by IC and IN routes. A possible explanation for the apparent failure of the IC and IN routes could be the blocking of these narrow passageways by the large MSCs, which may have been trapped in the site of injection or in the neighborhood.

Systemically administered MSCs have been shown to stably engraft into several tissues and organs (reviewed in 36). Migration of MSCs administered in the peripheral circulation has been evaluated in animal models of cerebral ischemia and myocardial infarction (37, 38). All these studies show that MSCs can migrate to the site of injury. Some studies have also reported the engraftment of MSCs in immunodeficient mice (39-41) with a low level engraftment of cells that, however, could be found in various tissues, including bones and bone marrow.

Few studies, however, have evaluated the fate of MSCs in normal mice (28, 42, 43). When injected into the lateral ventricle of neonatal normal mice, MSCs have been shown to migrate throughout the forebrain and cerebellum without disruption to the host brain architecture, at 12 days postinjection. Some MSCs within the striatum and the molecular layer of the hippocampus have differentiated into mature astrocytes. They were also found in neuron rich regions and the presence of neurofilaments and neuronal markers, indicated that MSCs were also differentiated into neurons. These results suggest that MSCs are potentially useful for treating a variety of central nervous system disorders (42).

Gao et al. (43) showed the distribution pattern of MSCs labeled with  $^{111}\text{In}$ -oxine and infused into syngeneic rats via intra-artery (IA), intravenous (IV) and intraperitoneal cavity (IP), with or without addition of vasodilator (for IA and IV

injections). After both IA and IV infusion, MSCs were detected primarily in the lungs and then secondarily in the liver and other organs. The use of vasodilator reduced the homing to the lung and increased it to the liver, as well as to the bone marrow of long bones. Niyibizi et al. (28) reported that one week after transplantation of MSC in temporal vein of neonatal mice, the cells were widely distributed throughout the body of host mice as shown by whole body imaging technique. After 18 days the majority of infused cells were concentrated in lungs and liver, and after 35 days, a significant number of cells were found in bones.

As discussed above, the majority of studies with MSCs have infused the cells systemically and few still know about the biodistribution of MSCs administered by other routes. And even for intravenous injection, the majority of reports is concerning to some injury or pathology state, what leads to a differentiated homing of these cells.

Sex and age did not seem to influence the biodistribution pattern of MSCs. As expected, time after injection, as well as the number of injected cells, influenced on the amount of positive cells in each organ (intensity of PCR bands), but not in the biodistribution range, at least for IP route. However, whether time or number of cells influenced both on amount of positive cells per organ is a question to be better elucidated in a quantitative study, since the present study aimed to be qualitative and, although allows making some suggestions, it can not provide quantitative conclusions. Fluorescent cells were not observed by flow cytometry and only scarce cells could be seen by IHC in tissues that were positive by PCR analysis, probably due to the number of injected cells, which resulted in a reduced number of eGFP-positive cells per organ.

Despite of its qualitative profile, this study showed that the number and volume of injection adjusted for each route seemed to be adequate for the establishment of infused cells in different organs, although the conditions may be optimized for different therapeutic approach. Other investigators have used the same or similar cell numbers in stem cell treatment and tracking studies (28, 29, 44).

Surprisingly, the C57Bl/6 isogenic mice showed a large inter-individual variation. This has already been reported by other authors in pre-clinical studies of gene therapy as well as of biodistribution of viral vectors with these animals (45-47).

Since MSCs reached the brain when administered by IVC, IP and IV routes, it can be suggested that these cells are able to efficiently cross the blood-brain barrier in

both directions. Lee *et al.* (48) have already presented evidence that MSCs could migrate into the central nervous system in an injury context, but that has not yet been analyzed in normal animals.

## **Conclusions**

In conclusion, our results show that the IVC and IP routes result in similar biodistribution patterns of MSCs under our conditions, and suggest that MSCs may cross the blood-brain barrier in both directions. IC and IN routes are not adequate for the administration of these cells, probably due to their size. IV injection results in a restricted biodistribution, which however could be desirable in some approaches. In this scenario, the IP route could be considered an adequate option for MSC-based cellular therapy of wide spectrum, since it results in a wide biodistribution, including the brain, and constitutes one of the safer and less invasive routes of cell administration.

## **Methods**

### *Animals*

Adult (3 to 5 months) C57Bl/6 normal and eGFP (green mouse FM131, kindly provided by M. Okabe, Osaka University, Japan) mice were used in this study. The animals were kept under standard conditions in our animal house. All the experimental procedures were performed according to institutional guidelines.

### *Cells*

Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from eGFP mice and cultured as previously established and described (35). The cells were immunophenotyped by flow cytometry, after incubation for 30 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE)- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies specific for murine CD11b, CD29, CD31, CD44 and CD45 (Pharmingen BD, San Diego, CA). Excess antibody was removed by washing and the cells were analyzed using a FACScalibur cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton Dickinson, San Diego, CA) with the CellQuest software. At least 10,000 events were collected.

Osteogenic and adipogenic differentiation of MSC cultures was induced and analyzed as previously described (10).

### *MSC transplantation*

eGFP MSCs, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), were administered to normal C57Bl/6 mice through five different routes, in two experiments as detailed in Table 1. Experimental groups included three or four mice, of both genders. For intraventricular cerebral (IVC) injections, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (23/116µg/g body weight) and installed on a stereotactic frame. MSCs were injected in the left brain ventricle. Ventricle coordinates were 1.0 mm posterior to bregma, 1.0 mm right to the midline and 2.5 mm depth. Intraperitoneal (IP) and intravenous (IV) injections were given to mice manually contained or placed in a contensor. For intranasal (IN) administration, mice were anesthetized as above and the cells were gently injected in the left nostril with a syringe. For intracarotid (IC) injection, mice were anesthetized, the pile of ventral neck region was shaven and a longitudinal short incision was made. The carotid was isolated and clamped, and cells were injected above the clamped region.

After different periods of time, organs were collected from non-perfused (experiment 1) or perfused (0.9% saline, experiment 2) animals. Organs or tissues analyzed by PCR for eGFP included the brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, bone marrow, spinal cord and blood. The brain was subdivided in cortex, cerebellum, hypothalamus, striatum and bulb (experiment 1) or analyzed as a whole (experiment 2). The spleen, bone marrow and blood were also analyzed by flow cytometry. When positive by PCR, the brain, heart, lung, liver and kidney were also analyzed by immunohistochemistry (IHC).

### *PCR*

DNA was extracted with proteinase K, and the presence of transplanted MSCs in the tissues was assessed by PCR for the eGFP gene. A region of 183 bp was amplified with the following primers: GFP-5C 5' ACT TCA AGA TCC GCC ACA ACA T 3' and GFP-3C 5' TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC 3'. PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture containing 1 µl of cDNA, 0.1 mM of each primer, 1 mM of each dNTP, 1x Taq DNA polymerase buffer and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Co, Carlsbad, CA). PCR was performed with an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by cycles of denaturation at 94°C for 35 sec, annealing at 58°C for 45 sec, and extension at 72°C for 1 min, with a final extension step of 7 minutes. The samples were subjected to 40 cycles, and the

PCR products were analyzed on 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide. A region of the constitutively expressed *GAPDH* gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was amplified as a control with the following primers: sense 5' TTA CTTGTACAGCTCGTCCATGC 3' and antisense 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3', resulting in amplified fragment of 452 bp. A plasmid DNA with the eGFP gene was used as external control for the PCR.

### **Authors' contributions**

RSC conceived of the study and design it, carried out the MSC infusions and the follow up of experimental groups, as well as the molecular and immunohistochemistry analyses, and drafted the manuscript. PCC carried out the MSC culture. FVP and GVP carried out animals perfusion and tissues fixation for the immunohistochemical analysis. SM and RM carried out the cryoprotection and cryostat sections. MCF ... NBN participated in the conception and design of the study and its coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Thanks are due to Fabiano Araujo Fernandes for technical help with animal experimentation..

### **References**

1. Friedenstein AJ: **Osteogenic stem cells in the bone marrow.** *Bone and Mineral* 1991, **7**:243–272.
2. Kassem M: **Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications.** *Cloning and Stem Cells* 2004, **6**:369-374.
3. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED: **Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells.** *Exp Hematol* 2002, **30**:1454-1462.
4. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blachstad M, Reyes M , Verfaillie CM: **Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.** *Exp Hematol* 2002, **30**:896-904.
5. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE:

- Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential.** *Haematologica* 2003, **88**:845-852.
6. Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P, Benhaim P, Chen IS, Hedrick MH: **Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles.** *Hum Gene Ther* 2003, **14**:59-66.
  7. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KG, Hsieh SL, Chen TH: **Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.** *Blood* 2004, **103**:1669-1675.
  8. Fan CG, Tang FW, Zhang QJ, Lu SH, Liu HY, Zhao ZM, Liu B, Han ZB, Han ZC: **Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells.** *Cell Transplant* 2005, **14**:311-321.
  9. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K: **Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells.** *Haematologica* 2005, **90**:1017-1026.
  10. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB: **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci* 2006, **119**:2204-2213.
  11. Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porada G: **Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications.** *Curr Stem Cell Res Ther* 2006, **1**:365-369.
  12. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002, **418**: 41-49.
  13. Kassem M: **Stem cells: potential therapy for age-related diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1067**:436-442.
  14. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A: **Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work.** *Nature Medicine* 2004, **S42-S50**.
  15. Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T, Kan I, Barzilai R, Bahat-Stromza M, Barhum Y, Bulvik S, Melamed E, Offen D: **Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition.** *Stem Cells and Development* 2006, **15**:141–164.
  16. Behr L, Hekmati M, Fromont G, Borenstein N, Noel LH, Lelievre-Pegorier M, Laborde K: **Intra renal arterial injection of autologous mesenchymal stem cells in an ovine model in the postischemic kidney.** *Nephron Physiol* 2007, **107**:65-76.



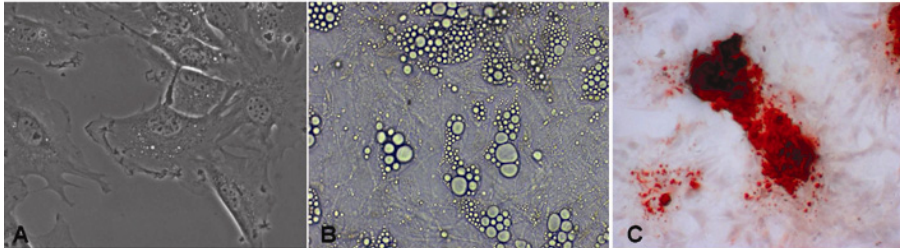
17. Lee Kb, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH: **Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model.** *Stem Cells* 2007, **25**:2964-2971.
18. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Iijima H, Nakamura T, Eguchi H, Miyoshi E, Hayashi N, Kawano S: **Topical Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Accelerates Gastric Ulcer Healing in Rats.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, in press.
19. Tsyb AF, Roshal LM, Konoplyannikov AG, Souchevitch GN, Verkhovskii YG, Shevchuk AS, Pavlova LN, Zhavoronkov LP, Semenova JB, Yuzhakov VV, Kolganova OI, Lushnikova GA, Ananyeva EP: **Evaluation of psychoemotional status of rats after brain injury and systemic transplantation of mesenchymal stem cells.** *Bull Exp Biol Med* 2007, **143**:539-542.
20. Kim JH, Park S-N, Suh H: **Generation of insulin-producing human mesenchymal stem cells using recombinant adeno-associated virus.** *Yonsei Medical Journal* 2007, **48**:109-119.
21. Braga LM, Rosa K, Rodrigues B, Malfitano C, Camassola M, Chagastelles P, Lacchini S, Fiorino P, De Angelis K, Schaan BD, Irigoyen MC, Nardi NB: **Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008, **35**:113-119.
22. Silva FH, Nardi NB: **From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors.** *Med Hypotheses* 2006, **67**:922-925.
23. Phillips MI, Tang YL: **Genetic modification of stem cells for transplantation.** *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **60**:160-172.
24. Kallifatidis G, Beckermann BM, Groth A, Schubert M, Apel A, Khamidjanov A, Ryschich E, Wenger T, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Krause U, Eckstein V, Mattern J, Chai M, Schutz G, Ho AD, Gebhard MM, Buchler MW, Friess H, Buchler P, Herrl: **Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer.** *Cancer Gene Ther* 2008, in press.
25. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ: **Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering.** *J Cell Mol Med* 2007, **11**:935-944.
26. Nirmalanandhan VS, Rao M, Shearn JY, Juncosa-Melvin N, Gooch C, Butler DL: **Effect of scaffold material, construct length and mechanical stimulation on the in vitro stiffness of the engineered tendon construct.** *J Biochem* 2007, in press.

27. Perin EC: **Stem Cell Therapy for Cardiovascular Disease. Evolving Standards in Cardiovascular.** *Care* 2006, **33**:204-208.
28. Niyibizi C, Wang S, Mi Z, Robbins PD: **The fate of mesenchymal stem cells transplanted into immunocompetent neonatal mice: implications for skeletal gene therapy via stem cells.** *Mol Ther* 2004, **9**:955-963.
29. Rochefort GY, Vaudin P, Bonnet N, Pages JC, Domenech J, Charbord P, Eder V: **Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies?** *Respir Res* 2005, **27**:125.
30. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL: **A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction.** *Eur Heart J* 2006, **27**:1114-1122.
31. François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A: **Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage.** *Stem Cells* 2006, **24**:1020-1029.
32. de Macedo Braga LM, Lacchini S, Schaan BD, Rodrigues B, Rosa K, De Angelis K, Borges LF, Irigoyen MC and Nardi NB: **In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction.** *J Biomed Sci* 2008, **15**:365-374.
33. Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD: **I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat.** *Neuroscience* 2005, **136**:161-169.
34. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA: **Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice.** *Transplantation* 2004, **78**:503-508.
35. Meirelles LS, Nardi NB: **Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization.** *Br J Haematol* 2003, **123**:702-711.
36. Bobis S, Jarocha D, Majka M: **Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications.** *Folia Histochem Cytobiol* 2006, **44**:215-230.

37. Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M: **MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture.** *Hematology* 2002, **7**:113-117.
38. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ: **Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects.** *Ann Thorac Surg* 2002, **73**: 1919-1956.
39. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ: **Cultures of adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:4857-4861.
40. Oyama M, Tatlock A, Fukuta S, Kavalkovich K, Nischimura K, Johnstone B, Robbins PD, Evans CH, Niybizi C: **Retrovirally transduced bone marrow stromal cells isolated from a mouse model of human osteogenesis imperfecta (oim) persist in bone and retain the ability to form cartilage and bone after extended passaging.** *Gene Ther* 1999, **6**:321-329.
41. Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR, Pochampally R, Prockop DJ: **A subset of human rapidly-self renewing marrow stromal cells (MSCs) preferentially engraft in mice.** *Blood* 2006, **107**: 2153-2161.
42. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: **Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **69**:10711-10716.
43. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI: **The dynamic *in vivo* distribution of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion.** *Cell Tissues Organs* 2001, **169**:10-20.
44. Weir C, Morel-Kopp MC, Gill A, Tinworth K, Ladd L, Hunyor SN, Ward C: **Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Characterisation and In Vivo Fluorescent Dye Tracking.** *Heart Lung Circ* 2008, in press.
45. Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D'Azzo A, Auricchio A, Ballabio A, Cosa MP: **Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**:1225-1236.
46. Mori S, Takeuchi T, Enomoto Y, Kondo K, Sato K, Ono F, Iwata N, Sata T, Kanda T: **Biodistribution of a low dose of intravenously administered AAV-2, 10, and 11 vectors to cynomolgus monkeys.** *Jpn J Infect Dis* 2006, **59**:285-293.
47. Watson G, Bastacky J, Belichenko P, Buddhikot M, Jungles S, Vellard M, Mobley WC, Kakkis E: **Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice.** *Gene Ther* 2006, **13**:917-925.

48. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K, Iwasaki Y: **Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice.** *Neuropathology* 2003, **23**:169–180.

## Figures



---

**Figure 1** - Mesenchymal stem cells characterization

(**A**) Mesenchymal stem cells in culture (phase contrast), and after differentiation into (**B**) adipocytes (phase contrast) and (**C**) osteocytes (stained with Alizarin Red). Original magnification x400.

## Tables

**Table 1** - Description of experimental groups

Essay	Route	PBS volume ( $\mu$ l)	Cell number	Analysis (days)
1	IVC	4	$10^6$	40
1	IP	30	$10^6$	34
2	IP	1,000	$5 \times 10^5$	80
2	IV	200	$10^5$	84
2	IN	20	$10^4$	84
2	IC	50	$10^5$	84

**Table 2** - Individual results of PCR analysis of C57Bl/6 mice transplanted with eGFP-positive MSCs by IVC and IP injections in experiment 1. n = 3 in each group. (-) negative, (+) or (++) positive according to the intensity of the gel band corresponding to amplification of the eGFP gene. Another sample table title

Organ/tissue	IVC injection			IP injection		
Brain – cerebellum	+	-	+	-	+	+
Brain - hypothalamus	-	+	-	-	+	+
Brain – striatum	+	+	-	+	+	+
Brain – bulb	+	+	-	+	+	+
Brain – cortex	+	+	-	+	+	+
Heart	+	-	+	+	+	+
Lung	+	-	+	+	+	+
Liver	+	+	+	-	-	+
Kidney	-	+	+	-	-	+
Spleen	-	+	+	-	+	-
Bone marrow	+	-	-	+	+	+
Spinal cord	+	+	-	+	+	+
Blood	-	-	-	-	-	-

**Table 3** - Individual results of PCR analysis of C57Bl/6 mice transplanted with eGFP-positive MSCs by IP and IV injections in experiment 2. n = 3 or 4 in each group. (-) negative, (+) positive for the eGFP gene.

Organ/tissue	IP injection				IV injection		
Brain	-	+	+	-	-	-	+
Heart	-	+	+	-	-	-	-
Lung	+	+	-	-	-	+	-
Liver	-	-	+	-	-	+	-
Kidney	-	+	+	-	-	+	-
Spleen	-	-	-	+	-	-	-
Bone marrow	+	-	+	-	-	-	-
Spinal cord	-	-	-	+	-	-	-
Blood	-	-	-	-	-	-	-

**CAPÍTULO IV**  
**- DISCUSSÃO -**



## 1. TERAPIA CELULAR

### BIODISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS (MSC)

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco do adulto multipotentes, capazes de se diferenciar em diferentes tipos celulares da linhagem mesenquimal. As MSCs são consideradas os melhores candidatos para terapia celular e gênica, via administração local ou sistêmica.

Nós descrevemos, pela primeira vez, o padrão de biodistribuição de MSCs isoladas de camundongos C57Bl/6 transgênicos eGFP. Estas células foram injetadas por cinco diferentes vias de administração em animais C57Bl/6 normais e seu padrão biodistribuição foi avaliada em 9 órgãos ou tecidos. Assim, estabelecendo as vias mais adequadas de acordo com a abordagem terapêutica.

As vias intraventricular cerebral (IVC) e intraperitoneal (IP) foram as que resultaram no mais amplo padrão de biodistribuição. A análise molecular por PCR mostrou que todos os órgãos ou tecidos analisados eram eGFP-positivos, com exceção do sangue, nos grupos que receberam o gene repórter por uma dessas duas vias.

A via intravenosa (IV) mostrou um padrão de biodistribuição mais restrito, atingindo apenas o cérebro, pulmão, fígado e rins. Por outro lado, não foi possível detectar células eGFP-positivas nos animais que receberam administração da célula via intranasal (IN) ou intracarotídea (IC). Uma possível explicação para isso seria a obstrução destas vias devido às grandes dimensões das MSCs, as quais podem ter ficado restritas ao sítio de injeção.

Há poucos estudos que avaliam o destino das MSC transplantadas em um contexto saudável (Kopen *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2001; Niyibizi *et al.*, 2004). Além disso, a maioria dos estudos com MSCs administram estas células sistemicamente e pouco ainda se sabe sobre a biodistribuição das MSCs administradas por outras vias.

Quando injetada via IVC em camundongos neonatos normais, estas células migram ao longo do córtex frontal e do cerebelo, sem danos à arquitetura cerebral, 12 dias após a injeção. Algumas MSCs no estriado e no hipocampo se diferenciam em astrócitos maduros. Elas também são encontradas em regiões ricas em neurônios, e a presença de neurofilamentos e neuromarcadores nestas células, indicam que elas também se diferenciam em neurônios. Estes resultados sugerem

que as MSCs apresentam um potencial promissor no tratamento de várias doenças do SNC (Kopen *et al.*, 1999).

As MSCs foram capazes de alcançar o cérebro a partir de administração via IP ou IV, e foram capazes de se difundir sistemicamente a partir de injeção IVC, sugerindo que estas células são capazes de cruzar a barreira hemato-encefálica em ambas as direções. Lee *et al.* (2003) já haviam mostrado evidências de que as MSCs podem migrar para o SNC num context de injúria, mas tal habilidade ainda não havia sido descrita em um contexto saudável.

Em resumo, nossos resultados mostram que, nas condições adotadas, as vias IVC e IP resultam em um padrão de biodistribuição similar das MSCs, e sugerem que estas podem atravessar a barreira hemto-encefálica em ambas as direções. A injeção IV resulta em uma biodistribuição um pouco mais restrita, o que pode ser desejável em algumas abordagens. Neste cenário, a via IP poderia ser considerada uma opção adequada para terapia celular, baseada em MSCs, de amplo espectro, já que ela resulta em uma ampla distribuição, incluindo o cérebro, e constitui umas das vias de administração mais seguras e menos invasivas.

## **2. TERAPIA GÊNICA**

Ao contrário de outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Huntington, onde a neurodegeneração é localizada, as manifestações neurológicas da MPSI são difusas por todo o SNC.

No contexto da terapia gênica, a dificuldade está em fornecer o vetor viral codificante da enzima deficiente em um grande volume cerebral, com um número mínimo de injeções. Além disso, o diagnóstico da MPSI se faz normalmente a partir do primeiro ano de vida, o que torna os estudos em animais recém-nascidos não apropriados para o tratamento desta doença.

As abordagens terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da MPSI são a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de medula óssea (TMO). A TRE é normalmente prescrita para o tratamento das formas mais moderadas da doença, nas quais não há comprometimento neurológico. Ou ainda, é pode ser prescrita em formas mais severas apenas como uma forma de atenuar

os danos sistêmicos e, assim, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, ainda que os danos neurológicos permaneçam.

O TMO também é uma possibilidade de tratamento bastante eficaz no contexto do comprometimento sistêmico e limitado no contexto neurológico, embora menos do que a TRE.

Ou seja, ainda não há uma abordagem terapêutica eficaz para a correção ou prevenção dos danos neurológicos. Atualmente, a terapia gênica (TG) é o único método viável para tratar o comprometimento do SNC, seja por transplante de células geneticamente modificadas, seja pela injeção de um vetor diretamente no cérebro. Em ambos os casos, observa-se uma superexpressão e secreção da enzima no cérebro.

Entretanto, a terapia *ex vivo* permite apenas a expressão transitória da enzima e uma difusão limitada da mesma no parênquima, a partir do sítio transplantado. Tal limitação torna-se crucial quando se trata de uma doença com lesões cerebrais difusas e que afetam todos os tipos celulares.

Assim, nossa abordagem foi estudar a eficácia da terapia gênica baseada no vetor AAV-2.5, após sua injeção no cérebro de camundongos adultos, no tratamento dos danos neuronais.

Nós mostramos um nível de atividade enzimática significativo no cérebro dos camundongos MPSI tratados. Nossos resultados confirmam a eficácia da expressão enzimática a partir do promotor PGK, já descrita por outros autores (Deglon *et al.*, 2000; Kordower *et al.*, 2000 ;Desmaris *et al.*, 2004).

No vetor que utilizamos, a expressão protéica foi também exacerbada pela presença de um *enhancer* WPRE, que estabiliza os RNAm e facilita seu transporte para o citoplasma (Zufferey *et al.*, 1999).

Nossos resultados mostraram níveis de atividade enzimática estáveis ao longo do tempo (durante mais de 16 semanas), indicando uma persistência da expressão gênica a partir do promotor PGK nas células do SNC dos camundongos. Tal resultado está de acordo com o descrito para vetores AAV2 e AAV5 com constituição genômica semelhante à utilizada por nós, ou seja, com promotor PGK e *enhancer* WPRE. Nesse trabalho, a atividade enzimática foi observada por mais de 32 semanas (Desmaris *et al.*, 2004).

A atividade enzimática detectada nos animais tratados foi superior à atividade observada nos camundongos normais. *A priori*, tal atividade elevada não apresentou efeito tóxico, uma vez que observamos uma melhora em nível bioquímico e histológico desses animais. Entretanto, nós não avaliamos as conseqüências da superexpressão e atividade de IDUA ao longo do tempo no modelo murino.

Nós mostramos que o vetor AAV e a enzima foram difundidos na quasi-totalidade do SNC dos camundongos KO, após injeção esterotáxica bilateral. Para avaliar a eficácia terapêutica, avaliamos o benefício do aporte de IDUA sob os aspectos bioquímicos e das lesões de depósito.

O déficit enzimático induz a lesões de depósito lisossomal significativas e difusas por todo o cérebro e todos os tipos celulares nos camundongos KO. Estas lesões são precoces e progressivas, agravando-se ao longo da vida.

A análise histológica do modelo murino de MPS I mostra comprometimento tanto visceral e sistêmico como neurológico (Clarke *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1998; Ohmi *et al.*, 2003). Um depósito lisossomal progressivo é observado em todos os órgãos. No SNC, as lesões lisossomais aparecem muito cedo no curso da doença, predominando inicialmente nas células gliais e depois nos neurônios e células de Purkinje, em um momento mais tardio. Tais lesões aumentam com a idade (Russell *et al.*, 1998). O estudo do SNC mostra perda progressiva de células de Purkinje no cerebelo em camundongos de 19 semanas de idade (Russell *et al.*, 1998). No córtex, a microglia é justaposta aos neurônios (Ohmi *et al.*, 2003). Microgliose e astrogliose foram também descritas em idade precoce nestes animais, com uma superexpressão de genes envolvidos no processo inflamatório (Ohmi *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, também observamos a presença de astrogliose e lesões de depósito lisossomal significativas nas células de Purkinje e neurônios, entretanto não detectamos perda celular evidente.

Além disso, descrevemos pela primeira vez a presença de esferóides axonais no contexto patológico da MPSI. Os esferóides axonais são característicos de várias doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, Esclerose Amiotrófica lateral, entre outras (Wirhth *et al.*, 2007; van Gerpen *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2008). Tal achado pode trazer novos *insights* sobre os

mecanismos fisiopatológicos da MPSI. Uma possível hipótese para a presença de esferóides na MPSI seria o comprometimento na via da fosfolipase (A2), como descrito para outras doenças neurodegenerativas (Gregory *et al.*, 2008).

Nós observamos uma completa correção das lesões de depósito nas regiões onde a enzima estava presente. A ausência de vesículas distendidas foi observada em todos os tipos celulares. E mesmo em regiões que apresentavam menor nível de atividade enzimática, uma correção igualmente evidente pôde ser observada. Estes resultados são coerentes com a noção de que mesmo uma pequena quantidade de enzima é suficiente para prevenir o processo de neurodegeneração (Ashton *et al.*, 1992). Ademais, como não observamos perda celular evidente, estes resultados indicam que a degeneração das células de Purkinje pode ser compensada.

Pela primeira vez, demonstramos a eficácia do aporte de IDUA por vetor AAV2.5 após injeção estriatal bilateral no modelo murino de MPSI, bem como a eficácia da expressão enzimática na correção dos danos do SNC. Nossos resultados mostram uma correção das lesões de depósito em todo o cérebro após uma única injeção.

A partir deste trabalho, podemos sugerir que a associação de TRE ou TMO e terapia gênica *in situ*, com vetor AAV2.5 pode vir a ser uma boa e eficaz opção terapêutica para o tratamento global dos comprometimentos sistêmico e neuronal da MPSI.

**ANEXO**  
**- OUTRAS PUBLICAÇÕES -**

**Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB**

*Sandrine Vitry<sup>1\*</sup>, Jérôme Ausseil<sup>1\*</sup>, Michael Hocquemiller<sup>1</sup>, Stéphanie Bigou<sup>2</sup>, Renata dos Santos Coura<sup>3</sup>, Jean Michel Heard<sup>1</sup>*

*\*Equal contribution*

<sup>1</sup> Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris, France

<sup>2</sup> Service de Neurologie Pédiatrique, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, INSERM U802, 94000, le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>3</sup> Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Corresponding author:** Jean Michel Heard

Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622

Département Neuroscience,

Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

Phone : 33-1-45688246 ; Fax : 33-1-45688940

e-mail : [jmheard@pasteur.fr](mailto:jmheard@pasteur.fr)

## Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB

Sandrine Vitry<sup>1\*</sup>, Jérôme Ausseil<sup>1\*</sup>, Michael Hocquemiller<sup>1</sup>, Stéphanie Bigou<sup>2</sup>, Renata dos Santos Coura<sup>3</sup>, Jean Michel Heard<sup>1</sup>

*\* Equal contribution*

<sup>1</sup> Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris, France

<sup>2</sup> Service de Neurologie Pédiatrique, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, INSERM U802, 94000, le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>3</sup> Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Corresponding author:** Jean Michel Heard

Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622

Département Neuroscience,

Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

Phone : 33-1-45688246 ; Fax : 33-1-45688940

e-mail : [jmheard@pasteur.fr](mailto:jmheard@pasteur.fr)



## **Abstract**

The interruption of the lysosomal degradation of heparan sulfate oligosaccharides has deleterious consequences on the central nervous system in children or in animals with mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). Behavioural manifestations are prominent at disease onset, suggesting possible early synaptic defects in cortical neurons. We report that synaptophysin, the most abundant protein of the synaptic vesicle membrane, was detected at low levels in the rostral cortex of MPSIII type B mice as early as 10 days after birth. This defect preceded other disease manifestations, was associated with normal neuron and synapse density and corrected after gene transfer inducing re-expression of the missing lysosomal enzyme. Clearance of heparan sulfate oligosaccharides in cultured embryonic MPSIIIB cortical neurons or treatment with proteasome inhibitors restored normal synaptophysin levels indicating that heparan sulfate oligosaccharides activate the degradation of synaptophysin by the proteasome with consequences on synaptic vesicle components that are relevant to clinical manifestations.

## Introduction

Mucopolysaccharidosis (MPS) type III (Sanfilippo syndrome) is a lysosomal storage disease due to a defect of a lysosomal hydrolase necessary for the stepwise degradation of the saccharide chains of the heparan sulfate (HS) glycosaminoglycans (GAGs). Interruption of HS degradation results in the abnormal production and accumulation of HS oligosaccharides with deleterious effects on the central nervous system (CNS). Typical early onset neurological manifestations in affected children are progressive behavioural changes including aggressiveness, endangering behaviour and mental retardation, which progressively evolve towards polyhandicap and premature death (Neufeld and Muenzer, 2001). Pathogenic mechanisms due to abnormal HS oligosaccharide catabolism are not understood.

Mouse models are available for two subtypes of MPSIII, subtype A (MPSIIIA)(Bhaumik et al., 1999), due to a deficiency of sulfamidase (EC 3.10.1.1), and subtype B (MPSIIIB)(Li et al., 1999), due to a deficiency of N-acetylglucosaminidase (NaGlu, EC 3.2.1.50). Both animal models exhibit abnormal behaviours that recapitulate MPS symptoms observed in children (Crawley et al., 2006; Cressant et al., 2004; Fu et al., 2007; Heldermon et al., 2007; Lau et al., 2008; Li et al., 1999). Pathological studies of affected mouse brain revealed progressive installation and aggravation of chronic brain inflammation and widespread CNS pathology (Ausseil et al., 2008; Ohmi et al., 2003). Whereas neuronal loss is delayed, the extensive vacuolation of microglia, perivascular cells, meninges, astrocytes and neurons is an early characteristic feature of the disease. Other markers of neuropathology include the secondary accumulation of  $G_{M2}$  and  $G_{M3}$  gangliosides (Li et al., 1999), the accumulation of immunoreactive subunit c of mitochondrial ATP synthase (Ryazantsev et al., 2007) that might be related to impaired autophagy (Settembre et al., 2007), the inhibition of neurogenesis, the reduced expression of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) mRNA and the increased expression of mRNAs coding for the 43 kDa growth-associated protein (GAP43), a protein of the synaptic membrane (Li et al., 2002).

Synaptophysin is the most abundant protein in the synaptic vesicle membrane (Evans and Cousin, 2005). Synaptophysin expression decreases with age in the brain of the mouse models of Alzheimer disease (AD) (Dong et al., 2007; Jacobsen et al., 2006) and with cognitive decline in AD patients (DeKosky and Scheff, 1990; Mukaetova-Ladinska et al., 2000; Reddy et al., 2005; Scheff et al., 1990). It is also reduced in other human neurological disorders like amyotrophic lateral sclerosis (Schiffer et al., 1995), human immunodeficiency virus induced dementia (Jones et al., 2007), schizophrenia (Davidsson et al., 1999) and in the mouse model of prion disease (Cunningham et al., 2003). There are common features shared by CNS alterations in MPSs and neurodegenerative processes in adults, especially AD. They include intracellular and extracellular accumulation of abnormal products, activation of microglia (Wyss-Coray, 2006), neuro-axonal dystrophy (Brendza et al., 2003), alteration of the lysosomal (Nixon and Cataldo, 2006) and autophagy (Pickford et al., 2008; Yu et al., 2005) degradation pathways.

Here we examined whether synaptophysin expression was modified in MPSIIIB, which in addition to modification of GAP43 expression, would indicate possible synaptic alteration related to HS oligosaccharides accumulation. Studies were performed in the mouse *mc*  $\psi$ MPSIIIB corrected or not by gene therapy in the brain. We also analysed the expression of synaptic proteins in cultures of embryonic MPSIIIB neurons in which the genetic defect was corrected or not by gene transfer. We observed a specific defect of synaptophysin expression both in the rostral cortex and in neurons isolated from the cortex of MPSIIIB mice. This defect was not associated with a reduction of neuron or synapse numbers. It was reversed both in vivo and in vitro when gene transfer complemented the enzymatic deficiency. As a target of specific E3 ubiquitin ligases, synpatophysin is degraded through the ubiquitin-proteasome pathway (Wheeler et al., 2002). We showed that MPSIIIB cortical neuron cultures recovered wild type synaptophysin level when proteasome activity was inhibited, demonstrating a dysregulation of this degradative pathway.

## Results

### *Synaptophysin expression is low in the MPSIII B mouse rostral cortex*

We examined the expression of synaptophysin, GAP43 and synaptobrevin by western blot in the mouse brain at 10 days and 8 months of age (Fig. 1). Proteins were extracted from the rostral cortex, the caudal cortex, or the cerebellum and signals were quantified relative to actin. At 10 days, synaptophysin was 1.5 fold lower in the rostral cortex of MPSIII B mouse than in control mice, and similar in other regions. GAP43 amounts were equivalent in MPSIII B and control mice whatever the location. At 8 months, synaptophysin was 1.7 fold lower and GAP43 was 1.9 fold higher in the rostral cortex of MPSIII B mice, as compared to controls, or similar in other regions. Synaptobrevin levels were equivalent at both ages and in all regions examined. A previous study showed that GAP43 mRNAs were more abundant in the cortex of young MPSIII B mice (Li et al., 2002). Here we provide evidence for an increased GAP43 protein expression at an advanced stage of the disease. In contrast to GAP43, the decrease in synaptophysin expression was already prominent in very young animals.

Amounts of mRNAs coding for synaptophysin, GAP43 and synaptobrevin were measured by qRT-PCR in the rostral cortex of wild type and MPSIII B mice at 10 days and 8 months (Fig. 2). With the exception of GAP43 mRNA amounts that were 1.6 fold higher in MPSIII B than in wild type mice at 8 months, as previously described (Li et al., 2002), results showed equivalent expression levels of synaptophysin and synaptobrevin transcripts in MPSIII B mice and controls. Thus, low synaptophysin expression was associated with normal synaptophysin mRNA level in the rostral MPSIII B mouse cortex.

### *Low synaptophysin expression is associated with normal neuron and synapse densities in the MPSIII B mouse rostral cortex*

High levels of GAP43 and normal level of synaptobrevin did not suggest neuronal loss in the rostral part of the MPSIII B mouse cortex. Nevertheless, we excluded the possibility of a cortical atrophy by measuring cortical area and thickness on low magnification pictures of parasagittal brain sections after immunostaining for MAP2, a protein expressed in neuron soma and dendrites (Fig. 3A).

Scoring of the number of nuclei stained for the neuronal marker NeuN per section surface unit indicated equivalent neuronal density in the rostral cortex of MPSIIIB and wild type mice at 8 months (Fig. 3B). We concluded that neuronal loss did not account for reduced synaptophysin expression.

We then examined synaptophysin expression in the rostral cortex by immunofluorescence on parasagittal brain sections. Synaptophysin and synaptobrevin immunostainings were combined and confocal images were acquired at high resolution. The numbers of synaptophysin- or synaptobrevin-positive puncta were scored in each cortical lamina (Fig. 4). Data showed a global 1.4 fold reduction of the density of synaptophysin-positive puncta in the MPSIIIB mouse cortex, as compared to controls. Reduction predominated in laminae I (1.5 fold) and II (1.8 fold). The density of synaptobrevin-positive puncta was equivalent in the MPSIIIB or wild type mouse cortex. These results indicate a change in the ratio of synaptic protein components rather than of synapse number in the MPSIIIB mouse rostral cortex.

#### *Correction of the enzyme defect restores normal synaptophysin and GAP43 expression in the MPSIIIB mouse brain*

Correction of the genetic defect induces the disappearance of HS oligosaccharides and corrects lysosomal storage in the brain of MPSIIIB mice. Correction is attested by the reversal of brain pathology, the reduction of microglia activation and inflammation, the normalisation of  $G_{M2}$  and  $G_{M3}$  ganglioside overload and the improvement of performances in behavioural tests (Ausseil et al., 2008; Cressant et al., 2004). We examined whether correction of the genetic and enzymatic defects would also affect the expression of synaptophysin and/or GAP43 in the MPSIIIB mouse brain.

For that purpose, 6-week-old MPSIIIB mice were treated by a single intracranial injection of adeno-associated vectors (AAV) coding for human NaGlu. According to our observations in 10-days-old MPSIIIB mice (Fig. 1), we reasoned that treated mice already had low synaptophysin levels in the rostral cortex at 6 weeks of age, before AAV injection. Treated mice were analysed 3.5 months after injection, at the age of 5 months. Consistently with our previous findings (Cressant et al., 2004), NaGlu activity was detected in the entire brain of treated MPSIIIB mice indicating efficient gene transfer and

expression in the brain (Fig. 5). Activity levels were higher than normal levels in the injected hemisphere and one-third than normal levels in the ipsilateral non-injected hemispheres. Western blots (Fig. 5) showed synaptophysin and GAP43 levels equivalent to age-matched wild type mice in the injected hemisphere, and intermediate levels between wild type and MPSIIIB mice in the non-injected hemisphere. These results indicated that NaGlu expression reversed abnormal synaptophysin and GAP43 expression in the MPSIIIB mouse brain.

#### *Reduced synaptophysin expression is intrinsic to cortical neurons*

Development of pathology in the MPSIIIB mouse brain is associated with activation of microglia and astrogliosis (Ausseil et al., 2008; Ohmi et al., 2003). Since the inflammatory environment may affect neurons in vivo (Stagi et al., 2005), we examined the expression of synaptophysin and GAP 43 in pure embryonic MPSIIIB cortical neuron cultures, which are devoided of astrocytes and microglia.

We measured the amounts of synaptophysin, GAP43 and synaptobrevin mRNAs in mature cortical neuron cultures after 12 days in vitro (Dotti et al., 1988) (Fig. 6A). Data showed an increased of GAP43 mRNAs in cultured MPSIIIB cortical neurons, as compared to wild type. This result is consistent with observations in the brain of adult affected mice (Fig. 1). Western blots were performed on proteins extracted from cultured neurons (Fig. 6B). Again, data were consistent with in vivo observations, showing a reduced expression of synaptophysin, an increased expression of GAP43 and a normal level of synaptobrevin in MPSIIIB, as compared to wild type cortical neuron cultures. Protein expression was then examined by immunofluorescence in neuronal soma and processes (Fig. 6C). The synaptobrevin signal was equivalent in MPSIIIB neurons and controls. The synaptophysin signal in MPSIIIB neurons was 3 folds lower than in controls in the cell soma, and 2.7 folds lower than in controls in the processes. The GAP43 signal in MPSIIIB neurons was equivalent to controls in the cell soma and increased in processes. These results indicated that changes in synaptophysin and GAP43 expression observed in the MPSIIIB mouse cortex were equally prominent in pure cortical neuron cultures and therefore not related to the inflammatory environment but intrinsic to neurons.

This conclusion was confirmed by the in vitro genetic correction of MPSIIIB neurons by lentivirus vectors coding for the missing enzyme NaGlu. Immunostaining indicated that, in contrast to untreated MPSIIIB neurons that were totally deficient for NaGlu expression, 68%±5% of treated MPSIIIB neurons expressed immunodetectable level of NaGlu (Fig. 6C). The synaptophysin signals in soma and processes, as well as the GAP43 signal in processes, returned to normal values in treated MPSIIIB neurons (Fig. 6C), indicating that the intrinsic synaptophysin and GAP43 expression defects were corrected when the missing lysosomal enzyme was re-expressed.

#### *Synaptophysin degradation by the proteasome is enhanced in MPSIIIB neurons*

In normal neurons, synaptophysin degradation is processed through the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Willeumier et al., 2006). However, since MPSIIIB is a disorder affecting lysosomal functions, we wondered whether low synaptophysin levels in MPSIIIB neurons could be due to the aberrant degradation of this protein in lysosomes or related vesicles.

We examined the distribution of synaptophysin between lysosomal and non-lysosomal organelles in cultured cortical neurons. Cells were triply stained for synaptophysin, LAMP1, a marker of late endosomes-lysosomes and GM130, a marker of cis-Golgi vesicles. Synaptophysin signal colocalising with LAMP1 but not with GM130 was considered to be located in lysosomes (Fig. 7A). Although lysosomes were enlarged in MPSIIIB neurons, the proportion of synaptophysin protein located in lysosomes was 1.7 fold lower than in wild type neurons, and 4.3 folds less lysosomes contained synaptophysin. Synaptophysin signal colocalising with GM130 but not with LAMP1 was considered to be located in non-lysosomal organelles, presumably in cis-Golgi saccules (Fig. 7B). The proportion of synaptophysin located in non-lysosomal organelles was 1.7 fold lower in MPSIIIB than in wild type neurons, and 4.6 folds less of these organelles contained synaptophysin. Equal diminution of synaptophysin expression in lysosomal and non-lysosomal organelles indicated that synaptophysin was not preferentially addressed to lysosomes in MPSIIIB neurons.

We then examined synaptophysin expression in cortical neuron cultures treated with drugs inhibiting protein degradation by the proteasome (MG132 or lactacystin) or by the lysosome

(leupeptin). The intensity of the synaptophysin signal was quantified in the soma of treated neurons. Wild type cortical neuron cultures incubated with the proteasome inhibitors MG132 (5 or 10  $\mu\text{g/ml}$ , higher concentrations being toxic) showed a mild increase of synaptophysin expression after 4 hours (1.1 and 1.6 folds, Fig. 8A and supplemental Fig. S1). Similar observations were made in genetically corrected MPSIIIB neurons (1.7 and 1.8 folds, respectively). In enzyme-deficient MPSIIIB neurons, a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  of MG132 increased synaptophysin expression 3.6 folds, restoring levels equivalent to wild type neurons. The restoration of wild type synaptophysin levels in MG132-treated MPSIIIB neurons was confirmed by western blots (Fig. 8B). The expression of GAP43 was not affected by MG132 treatment. Treatment of MPSIIIB neurons by the proteasome inhibitor lactacystin (2.5  $\mu\text{M}$  for 4 hours) resulted in a similar increased of synaptophysin expression (Fig. 8C and supplemental Fig. S1). In contrast, incubation of MPSIIIB neurons with leupeptin (50  $\mu\text{M}$ , 48 hours), an inhibitor of lysosomal serine and cysteine proteases, did not increase synaptophysin expression (Fig. 8C and supplemental Fig. S1). These results are consistent with the enhancement of synaptophysin degradation by the proteasome but not by the lysosomes in MPSIIIB neurons.



## Discussion

At clinical onset, neurological manifestations of MPSIIIB are evocative of frontal pathology. Consistently, we showed that the expression of synaptophysin was altered at a very early stage of the disease course in the rostral part of the MPSIIIB mouse cortex. Synaptophysin is a protein associated with synaptic vesicles, which presumably participates to exocytosis and the release of neurotransmitters (Evans and Cousin, 2005). Our observations in the MPSIIIB mouse suggested a change in the ratio of the components of the protein complex involved in synaptic vesicle exocytosis. Together with the previously reported increased expression of GAP43 (Li et al., 2002), a protein involved in  $Ca^{2+}$ -dependent neurotransmitter release and activity-dependent synaptic remodelling (Benowitz and Routtenberg, 1997), this result points to the possibility of alterations relevant to synaptic plasticity in neurons located in the rostral part of the MPSIIIB cortex.

The decreased expression of synaptophysin is most often interpreted as an indication of synaptic loss correlated to decreased spine numbers or neuronal loss. In Alzheimer disease, this interpretation is supported by ultrastructural data and by the simultaneous loss of other synaptic markers (Reddy et al., 2005). Although we did not directly score the synaptic density by electron microscopy, the absence of cortical atrophy and neuronal loss, the normal densities of synaptobrevin positive puncta as well as the normal expression levels of synaptobrevin, and the t-SNARE proteins SNAP25 and syntaxin1 (supplemental data Fig. S2) suggest that the synaptic density was not reduced in the MPSIIIB mouse cortex. Our results are therefore consistent with a modification of the synaptic vesicle components. Observations made in the rostral cortex of MPSIIIB mice were confirmed by the study of MPSIIIB cortical neuron cultures. We measured a 3-folds reduction of synaptophysin expression and a normal expression of synaptobrevin. In cultured neurons, immunofluorescence labelling revealed that the synaptophysin signal was reduced both in the cell soma and in the neuron processes.

The production of HS oligosaccharides due to the interruption of the HS degradation pathway in lysosomes is the primary consequence of the enzyme defect in MPSIIIB. This production triggers a cascade of pathological events that progressively leads to CNS pathology. Abnormally low

synaptophysin expression was already prominent at the age of 10 days, thus preceding most other visible manifestations of the disease. The accumulation of GAGs was already high at this stage in the MPSIIIB mouse brain (Ausseil et al., 2008). The synaptophysin expression defect was observed in pure neuronal cultures and is therefore not secondary to the activation of microglia, which is detectable in the MPSIIIB mouse brain at about the same time (Ausseil et al., 2008). These results suggest that the reduced expression of synaptophysin is a cell autonomous defect. This defect was reversed, both in vitro and in the brain, through the delivery of the missing enzyme NaGlu through gene therapy. Since NaGlu clears HS oligosaccharides accumulating in MPSIIIB tissues, this observation demonstrates that the reduction of synaptophysin expression was a consequence of HS oligosaccharide accumulation.

Reduced synaptophysin expression in Golgi compartment of MPSIIIB neurons suggested decreased synthesis, enhanced degradation, or a combination of both phenomena. Because cultures of embryonic cortical neurons from mutant mice could be generated in limited amounts only, we could not determine synaptophysin synthesis and degradation rates conclusively in MPSIIIB neurons. However, treatment of these cells with drugs inhibiting lysosomal or proteasomal degradation provided clear evidence for an enhanced degradation of synaptophysin by the ubiquitin proteasome system but not by the lysosomes. The peptide aldehyde MG132 is a substrate analog and a reversible inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome, which also inhibits certain lysosomal cysteine proteases, the cathepsin B and the calpains (van Kerkhof et al., 2001). Lactacystin is an irreversible inhibitor of the chymotrypsin-like and trypsin-like activities of the proteasome, which does not inhibit lysosomal protein degradation (Fenteany and Schreiber, 1998). The recovery of synaptophysin expression levels equivalent to wild type neurons in cultured MPSIIIB neurons treated with MG132 or lactacystin indicated enhanced degradation in untreated MPSIIIB neurons. The recovery of wild type synaptophysin expression level was not secondary to the inhibition of an abnormal degradation of the mutant NaGlu protein, since disruption of NaGlu gene at exon 6 totally abolished NaGlu synthesis in the transgenic mouse (Li et al., 1999). Because synaptophysin addressing to lysosomes was less frequent in MPSIIIB than in wild type neurons and leupeptin, a drug inhibiting lysosomal proteases, did

not increase synaptophysin level, we concluded that synaptophysin degradation by the lysosomes was marginal or inexistent in MPSIIIB neurons, and therefore not the cause of reduced synaptophysin expression levels. Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in MPSIIIB neurons suggests that HS oligosaccharides accumulating in these cells altered the control of synaptophysin turn-over.. In normal cells, This process is triggered by the synaptophysin specific E3 ubiquitin ligases *seven in absentia* homologs (Siah) (Wheeler et al., 2002). HS oligosaccharides could either abnormally activate the activity of the Siah ubiquitin ligases or abnormally induce the recognition and ubiquitination of synaptophysin by these proteins. Our results provide a first example of the implication of the proteasome in the cell disorders associated to lysosomal storage diseases, in addition to the previously described impaired degradation of macromolecules by the lysosomes and the autophagy pathways (Settembre et al., 2007). Malfunctions of the ubiquitin-proteasome system are critically involved in the pathogenesis of a number of neurodegenerative diseases (Hegde and Upadhyya, 2007).

It is intriguing that synaptophysin expression defect was detected in the rostral cortex and not in other cortical regions. Since HS oligosaccharide accumulation is equally distributed in brain tissues (McGlynn et al., 2004), it may not account for apparent predominance of reduced synaptophysin expression in the frontal cortex. We actually cannot exclude that reduced synaptophysin expression was also present outside the frontal cortical area. Higher synaptic density in the frontal cortex than in other examined areas may explain why the deficit was more conspicuous in this area.

Suppression of synaptophysin expression in knockout mice (McMahon et al., 1996) or of the tetraspan proteins, to which synaptophysin belongs, in *C-elegans* (Abraham et al., 2006) did not reveal essential role in synaptic vesicle exocytosis. It is nonetheless clear that synaptophysin determines synaptic strength. Its expression was found associated to improved cognition (Liu et al., 2008). Both antisense oligonucleotides complementary to synaptophysin mRNA and microinjection of synaptophysin antibodies reduce calcium-dependent neurotransmitter secretion (Alder et al., 1992a; Alder et al., 1992b). An interaction between synaptophysin and synaptobrevin has been demonstrated indicating implications in the control of exocytosis (Edelmann et al., 1995). This interaction has also

been suggested to be important for synaptic vesicle maturation (Becher et al., 1999). The implication of synaptophysin in synaptic functions makes it likely that a defect of expression in the rostral cortex has impact on MPSIIIB mouse behaviour.

It is remarkable that the delivery of the missing lysosomal enzyme NaGlu by gene therapy has the capacity to reverse the decrease of synaptophysin expression and prevents the increase of GAP43 expression in the brain of treated MPSIIIB mice. In mice, reversion to a normal phenotype upon delivery of the missing enzyme was effective after 6 weeks during which HS oligosaccharides had accumulated in brain tissue, indicating the absence of major destructive effects induced by HS oligosaccharide accumulation at this early stage. Correction of synaptic alterations is relevant to the improvement of animal behaviour upon treatment, which was previously reported (Cressant et al., 2004; Fu et al., 2007). It is consistent with the notion that synaptophysin and GAP43 are essential to optimal neuronal functioning. Efficacy of gene therapy on the expression of these relevant disease markers supports the hope that this treatment might provide benefit with respect to the prevention of mental retardation and behavioural manifestations in children with MPSIIIB.

## Experimental Methods

### *Antibodies and reagents*

Cell culture reagents, media and phosphate buffer saline (PBS) were from InVitrogen, fetal calf serum was from PAA Laboratories. All other products were from Sigma if not specified otherwise. The following antibodies were used (dilutions are for immunofluorescence only): mouse IgM monoclonal anti-synaptophysin (clone SP15, 1:200, Serotec) or rabbit IgG anti-synaptophysin (1:200, Synaptic Systems), rabbit IgG anti-GAP43 (1:500, Abcam), rabbit IgG anti-actin (Abcam), mouse IgG1 monoclonal anti-GM130 (1:200, BD Biosciences), mouse IgG1 monoclonal anti-NeuN (1:200, Chemicon), rabbit IgG anti-synaptobrevin (1:1000, Synaptic Systems), rat monoclonal IgG2b anti-LAMP1 (clone 1D4B, 1:500, BD Biosciences), mouse monoclonal IgG2a anti-betaIII-tubulin (clone Tuj1, 1:500, Covance), mouse monoclonal IgG1 anti-MAP2ab (clone AP20, 1:1000, Sigma). Appropriate secondary antibodies conjugated to Alexafluor<sup>®</sup> 488, 555 or 647 were from Invitrogen. Nuclei were stained with Hoechst 33342.

### *Mouse experiments*

Mouse experiments were approved by the Institut Pasteur ethical committee for animal research and performed by authorized investigators (authorization no. 75-268, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). C57Bl/6<sup>NaGlu+/-</sup> heterozygote mice (from Pr. E. Neufeld, UCLA, Los Angeles, CA) (Li et al., 1999) were mated and their progeny was genotyped by PCR on DNA from tail-clipped. Mice, wild type or C57Bl/6<sup>NaGlu-/-</sup> MPSIIIB, were euthanized with a lethal injection of ketamine before intracardiac perfusion with PBS or PBS plus fixative.

### *Fetal mouse cortical neuron cultures*

E17 embryos were obtained from C57Bl/6<sup>NaGlu+/-</sup> heterozygote females matched with heterozygote males. Pregnant females were euthanized by cervical dislocation. During embryo genotyping, brain tissues were kept on ice in HBSS supplemented with 50 µg/mL gentamicine then cerebral cortices of embryos with a same NaGlu<sup>-/-</sup> or NaGlu<sup>+/+</sup> phenotype were pooled together. Cells were prepared and plated as previously described (Meberg and Miller, 2003). Briefly, meninges-free cortices were cut into

small pieces and treated with protease (9 units/mL) and DNase (400 units/mL, Roche) for 10 minutes before trituration. Dissociated cells were centrifuged and resuspended in Neurobasal medium supplemented with 2% FCS, 2% B27 supplement, 1% N2 supplement, 25  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM glutamine and 50  $\mu$ g/mL gentamicine. Cells were plated at a density of  $10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on petri dishes or round coverslips (VWR) previously coated with 50  $\mu$ g/mL poly-ornithine followed by 5 $\mu$ g/mL laminine. On day 1, cultures were treated with 25  $\mu$ g/mL uridine and 10 g/mL fluorodeoxyuridine to eliminate proliferating glial cells. This resulted in a quite pure neuronal culture. On day 3, neurons were exposed to lentivirus vectors coding for human NaGlu (10 ng of Human Immunodeficiency Virus p24 protein/coverslip). Neurons were then treated with leupeptin (50  $\mu$ M, 48 hours) at 8 days in vitro, or with MG132 (5 or 10  $\mu$ g/mL, 4 hours) or lactacystin (2.5  $\mu$ M, 4 hours) at 10 days in vitro.

#### *Viral vectors*

Adeno-associated virus vector structure, production and stereotactic injections in mouse brain were previously described (Ausseil et al., 2008). The AAV2.5-hNaGlu vector is a hybrid AAV vector in which the capsid is from the AAV5 serotype and the genome from the AAV2 serotype. The vector genome contains the Inverted Terminal Repeats (ITRs) of AAV2, the mouse  $\mu$ inosphoglycerate kinase-1 gene promotor (mPGK), the human NaGlu cDNA (Zhao et al., 1996) and the bGH polyadenylation sequence. Vector batches were produced in HEK293 cells and vector genome (vg) concentration in batches was quantified by dot blot. Six-week-old C57Bl/6<sup>NaGlu<sup>-/-</sup></sup> MPSIIIB mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1/0.01 mg per gram of body weight) and installed on a stereotactic frame. Animals received a single 5  $\mu$ l injection of  $3 \times 10^9$  vg in the right striatum.

Lentivirus vectors coding for human NaGlu were produced from plasmid pRRL-sin-PPT-mPGK-hNaGlu-WPRE, which was constructed by inserting the human NaGlu cDNA (Zhao et al., 1996) into pRRL-sin-PPT-hPGK-GFP-WPRE, a plasmid coding for the HIV-GFP lentivirus vector (a gift from L. Naldini, University of Torino, Italy) (Zufferey et al., 1997). HIV vectors were prepared as previously described by cotransfecting HEK293 cells with a four-plasmid system including the above plasmids carrying the genes of interest, a second-generation pMDdeltaR8.93 packaging plasmid, a pRES-Rev

packaging plasmid and the VSV-G envelope protein expression plasmid (pMDG) (Zufferey et al., 1997). Supernatants were collected after 2 days. HIV Gag protein p24 measured in vector preparations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Du Pont) was routinely in the range of 700-1000 ng of p24/mL. Vector stocks concentrated by ultracentrifugation contained  $5 \times 10^5$  ng of p24/mL.

### *Quantitative PCR*

After intracardiac perfusion with PBS, mouse brains were removed and cortical fragments (3 mm<sup>3</sup>) were collected. Total RNA was extracted using either Trizol (Invitrogen) for cortex tissue or RNeasy kits (Qiagen) for cortical neuron cultures. One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA with oligo (dT)<sub>12-18</sub> (200 ng, Roche) and M-MLV reverse transcriptase (Superscript III, Invitrogen). Quantitative PCR was performed in a Model 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) with 100 ng of cDNA and the SYBR Green PCR Master Mix (according to Applied Biosystems procedures). Amplification parameters: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute. Each sample was analyzed in triplicate. Negative controls included omission of reverse transcriptase at the cDNA synthesis step and omission of the template at the PCR step. Additional controls performed for each cDNA amplification included optimization of primer concentration, assessment of amplification efficiency and detection of possible primer dimerization through analysis of dissociation curves. Ct (Cycle threshold) values were determined as the numbers of PCR cycles at which specific amplification of the target sequence occurred. Ct superior to 38 were considered as background signal. cDNA amounts were expressed as  $2^{\text{exp}(\text{Ct1}-\text{Ct2})}$ , in which Ct1 is a reference Ct measured for the amplification of ARPO (Acidic ribosomal phosphoprotein) cDNAs (Simpson et al., 2000) and Ct2 is the Ct measured for the amplification of the examined cDNA. Samples were analyzed in triplicate.

Design of primers was done using Primer Express software. ARPO, forward: 5'-TCCAGAGGCACCATTTGAAATT-3', reverse: 5'-TCGCTGGCTCCCACCTT-3'; GAP43, forward: 5'-CACCATGCTGTGCTGTATGAGA -3', reverse: 5'-TGTTCAATCTTTTGGTCCCTCATCA-3';

Synaptophysin, forward: 5'-ACCCTGTGACTTCAGGACTCAAC-3' reverse: 5'-ACCCAGAGCACCAGGTTTCAG-3'; Synaptobrevin, forward: 5'-GGAGTGATCTGCGCCATCAT-3', reverse: 5'-GGGCAGACTCCTCAGGGATT-3'

#### *Western blots*

After intracardiac perfusion with PBS, mouse brains were removed and cortical fragments (3 mm<sup>3</sup>) were collected. Brain fragments or cultured cortical neurons were homogenized in lysis buffer L [1% Nonidet P-40 (NP40), 0.2% deoxycholate, 0.15 M NaCl, and 50 mM Tris, pH 8.0] containing 1X of protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation of homogenates (12,000 g, 10 min), protein concentration was assayed in the supernatants. Ten micrograms of proteins were diluted in 4X Laemmli sample buffer, loaded on 4-12% Tris-glycine polyacrylamide gel electrophoresis (Invitrogen) after boiling for 3 minutes. Boiling for longer period of time (up to 20 minutes) did not affect the results. Proteins were transferred from gels to nitrocellulose membranes (Hybond plus, Amersham), which were blocked with 3% Bovine Serum Albumine (BSA) in PBS-0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C in PBS-Tween-1% BSA with the appropriate primary antibody (1:5,000). Membranes were then washed and revealed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (Amersham, 1:10,000) and enhanced chemiluminescence ECL (Pierce). Signal intensities were measured with the LAS-1000CH Luminescent photofilm LTD system, piloted by the IR-LAS-Pro software (Fuji). Specific signal values were normalised relatively to the actin signal.

#### *NaGlu enzymatic assay*

NaGlu assays were performed as described (Cressant et al., 2004), using 4-methylumbelliferyl (Calbiochem) as substrate. Fluorescence emission was measured at 340/440 nm using a Wallac<sup>2</sup> Victor fluorimeter. One activity unit corresponds to the hydrolysis of 1 nmol of substrate per hour and is expressed per mg of protein in extracts.

#### *Immunocytochemistry*

Cells were washed in PBS and fixed with PBS-4% paraformaldehyde for 15 minutes on ice. After blocking with PBS-0.1% saponin-1% BSA-2% normal goat serum, cells were incubated overnight at

17



4°C with primary antibodies diluted in the same blocking buffer. Bound antibodies were revealed by one-hour incubation at room temperature with fluorescent secondary antibodies. Coverslips were mounted in FluoromountG<sup>®</sup> (Southern Biotech).

### *Immunohistochemistry*

After intracardiac perfusion with PBS followed by PBS-4% paraformaldehyde (50 ml), mouse brains were removed and post-fixed in the same fixative for 1 hour at 4°C. Brains were then embedded in 20% gelatin and cut sagittally with vibratome (60 µm thick sections). Sections were delipidated for 3 minutes with pure ethanol, rinsed 3 times in PBS before overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in PBS-0.3% triton X100-1% BSA-2% normal goat serum. Bound antibodies were revealed by one-hour incubation at room temperature with fluorescent secondary antibodies. Coverslips were mounted in FluoromountG<sup>®</sup>.

### *Imaging*

Images of immunolabeled brain sections or cells were observed and acquired with either Axioplan 2 imaging optic microscope equipped with Apotome and AxioCam TR camera and controlled by the AxioVision software (Zeiss), or with a SP5 confocal system (Leica). Whatever the phenotype and/or treatment, time exposure was determined and then kept constant for all markers revealed in the same experiment (cortical sections or cultured neurons). Image quantification was performed using the Axiovision or ImageJ softwares. Fluorescent signal was binarised, keeping threshold constant for all acquisitions performed in the same experiment. Binarised synaptophysin and synaptobrevin positive puncta were scored in cortical brain sections as positive dots per section surface, excluding nuclei and vascular areas. Binarised signals produced by GAP43, synaptophysin and synaptobrevin staining were scored in cell soma and neurites of cultured neurons. The total surfaces of soma and neurites were then determined by reducing binarisation thresholds in order to record background signal on the entire cell surface. GAP43, synaptophysin and synaptobrevin positive areas expression levels were determined as ratios of specific marker to whole somatic or neuritic surface signals. Colocalisation

coefficients were determined with the Axiovision colocalisation module in manually delineated cell soma.

### *Statistical analysis*

Statistics were performed using the SPSS software (SPSS). The assumption that the values follow normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk's test. The non-parametric Mann-Whitney test were used when normal distribution was not assumed.

## **Acknowledgements**

We thank Pr. E. Neufeld for the gift of the MPSIIIB mice; Dr D. Bohl, Pr. M. Dubois-Dalcq and Pr J. Rossier for critical review of the manuscript. We are very grateful to the Centre d'Imagerie Dynamique of the Institut Pasteur and especially to E. Perret and P. Roux for their help in apotome and confocal analysis. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (grant and postdoctoral fellowship to J.A.), the association Vaincre les Maladies Lysosomales and the Caisse Autonome Nationale d'Assurance Maladie (CANAM)(PhD fellowship to M.H.), the Institut Pasteur and the brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (PhD fellowship to R.S.C.).

## References

- Abraham, C., Hutter, H., Palfreyman, M.T., Spatkowski, G., Weimer, R.M., Windoffer, R., Jorgensen, E.M., Leube, R.E., 2006. Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8227-8232.
- Alder, J., Lu, B., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M.M., 1992a. Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* oocytes: requirement for synaptophysin. *Science* 257, 657-661.
- Alder, J., Xie, Z.P., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M., 1992b. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9, 759-768.
- Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., Parent, M., Cheillan, D., Fuller, M., Maire, I., Vanier, M., Heard, J.M., 2008. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PloS ONE* 3, e2296.
- Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Margittai, M., Jahn, R., Ahnert-Hilger, G., 1999. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* 19, 1922-1931.
- Benowitz, L.I., Routtenberg, A., 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20, 84-91.
- Bhaumik, M., Muller, V.J., Rozaklis, T., Johnson, L., Dobrenis, K., Bhattacharyya, R., Wurzelmann, S., Finamore, P., Hopwood, J.J., Walkley, S., P., S., 1999. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology* 9, 1389-1396.
- Brendza, R.P., O'Brien, C., Simmons, K., McKeel, D.W., Bales, K.R., Paul, S.M., Olney, J.W., Sanes, J.R., Holtzman, D.M., 2003. PDAPP; YFP double transgenic mice: a tool to study amyloid-beta associated changes in axonal, dendritic, and synaptic structures. *J Comp Neurol* 456, 375-383.

- Crawley, A.C., Gliddon, B.L., Auclair, D., Brodie, S.L., Hirte, C., King, B.M., Fuller, M., Hemsley, K.M., Hopwood, J.J., 2006. Characterization of a C57BL/6 congenic mouse strain of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Brain Res* 1104, 1-17.
- Cressant, A., Desmaris, N., Verot, L., Brejot, T., Froissart, R., Vanier, M.T., Maire, I., Heard, J.M., 2004. Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J Neurosci* 24, 10229-10239.
- Cunningham, C., Deacon, R., Wells, H., Boche, D., Waters, S., Diniz, C.P., Scott, H., Rawlins, J.N., Perry, V.H., 2003. Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *Eur J Neurosci* 17, 2147-2155.
- Davidsson, P., Gottfries, J., Bogdanovic, N., Ekman, R., Karlsson, I., Gottfries, C.G., Blennow, K., 1999. The synaptic-vesicle-specific proteins rab3a and synaptophysin are reduced in thalamus and related cortical brain regions in schizophrenic brains. *Schizophr Res* 40, 23-29.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457-464.
- Dong, H., Martin, M.V., Chambers, S., Csernansky, J.G., 2007. Spatial relationship between synapse loss and beta-amyloid deposition in Tg2576 mice. *J Comp Neurol* 500, 311-321.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.
- Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., Jahn, R., 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *Embo J* 14, 224-231.
- Evans, G.J., Cousin, M.A., 2005. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans* 33, 1350-1353.
- Fenteany, G., Schreiber, S.L., 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* 273, 8545-8548.
- Fu, H., Kang, L., Jennings, J.S., Moy, S.S., Perez, A., Dirosario, J., McCarty, D.M., Muenzer, J., 2007. Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene Ther* 14, 1065-1077.

- Hegde, A.N., Upadhyay, S.C., 2007. The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. *Trends Neurosci* 30, 587-595.
- Heldermon, C.D., Hennig, A.K., Ohlemiller, K.K., Ogilvie, J.M., Herzog, E.D., Breidenbach, A., Vogler, C., Wozniak, D.F., Sands, M.S., 2007. Development of sensory, motor and behavioral deficits in the murine model of Sanfilippo syndrome type B. *PLoS ONE* 2, e772.
- Jacobsen, J.S., Wu, C.C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., Bloom, F.E., 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5161-5166.
- Jones, G.J., Barsby, N.L., Cohen, E.A., Holden, J., Harris, K., Dickie, P., Jhamandas, J., Power, C., 2007. HIV-1 Vpr causes neuronal apoptosis and in vivo neurodegeneration. *J Neurosci* 27, 3703-3711.
- Lau, A.A., Crawley, A.C., Hopwood, J.J., Hemsley, K.M., 2008. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behav Brain Res* 191, 130-136.
- Li, H.H., Yu, W.H., Rozengurt, N., Zhao, H.Z., Lyons, K.M., Anagnostaras, S., Fanselow, M.S., Suzuki, K., Vanier, M.T., Neufeld, E.F., 1999. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14505-14510.
- Li, H.H., Zhao, H.Z., Neufeld, E.F., Cai, Y., Gomez-Pinilla, S., 2002. Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *J. Neurosci. Res.* 69, 30-38.
- Liu, F., Day, M., Muniz, L.C., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., Grauer, S., Zhang, G., Kelley, C., Pulito, V., Sung, A., Mervis, R.F., Navarra, R., Hirst, W.D., Reinhart, P.H., Marquis, K.L., Moss, S.J., Pangalos, M.N., Brandon, N.J., 2008. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 11, 334-343.
- McGlynn, R., Dobrenis, K., Walkley, S.U., 2004. Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J Comp Neurol* 480, 415-426.

- McMahon, H.T., Bolshakov, V.Y., Janz, R., Hammer, R.E., Siegelbaum, S.A., Sudhof, T.C., 1996. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4760-4764.
- Meberg, P.J., Miller, M.W., 2003. Culturing hippocampal and cortical neurons. In: Hollenbeck, P.J., Bamberg, J.R. (Eds.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 111-127.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Garcia-Siera, F., Hurt, J., Gertz, H.J., Xuereb, J.H., Hills, R., Brayne, C., Huppert, F.A., Paykel, E.S., McGee, M., Jakes, R., Honer, W.G., Harrington, C.R., Wischik, C.M., 2000. Staging of cytoskeletal and beta-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 157, 623-636.
- Neufeld, E.F., Muenzer, J., 2001. The mucopolysaccharidoses. In: C.R. Scriver, A.L.B., W. S. Sly, D. Valle (Ed.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. ed. McGraw-Hill, New York, pp. 3421-3452.
- Nixon, R.A., Cataldo, A.M., 2006. Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9, 277-289.
- Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K., Ryazantsev, S., Li, H.H., Neufeld, E.F., 2003. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1902-1907.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., Wyss-Coray, T., 2008. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*.
- Reddy, P.H., Mani, G., Park, B.S., Jacques, J., Murdoch, G., Whetsell, W., Jr., Kaye, J., Manczak, M., 2005. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis* 7, 103-117; discussion 173-180.
- Ryazantsev, S., Yu, W.H., Zhao, H.Z., Neufeld, E.F., Ohmi, K., 2007. Lysosomal accumulation of SCMAS (subunit c of mitochondrial ATP synthase) in neurons of the mouse model of mucopolysaccharidosis III B. *Mol Genet Metab* 90, 393-401.

- Scheff, S.W., DeKosky, S.T., Price, D.A., 1990. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11, 29-37.
- Schiffer, D., Cordera, S., Giordana, M.T., Attanasio, A., Pezzulo, T., 1995. Synaptic vesicle proteins, synaptophysin and chromogranin A in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 129 Suppl, 68-74.
- Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampinato, C., Venturi, C., Medina, D., Pablo, R.D., Tacchetti, C., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2007. A Block of Autophagy in Lysosomal Storage Disorders. *Hum Mol Genet* 17, 119-129.
- Simpson, D.A., Feeney, S., Boyle, C., Stitt, A.W., 2000. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 6, 178-183.
- Stagi, M., Dittrich, P.S., Frank, N., Iliev, A.I., Schwille, P., Neumann, H., 2005. Breakdown of axonal synaptic vesicle precursor transport by microglial nitric oxide. *J Neurosci* 25, 352-362.
- van Kerkhof, P., Alves dos Santos, C.M., Sachse, M., Klumperman, J., Bu, G., Strous, G.J., 2001. Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. *Mol Biol Cell* 12, 2556-2566.
- Wheeler, T.C., Chin, L.S., Li, Y., Roudabush, F.L., Li, L., 2002. Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol Chem* 277, 10273-10282.
- Willeumier, K., Pulst, S.M., Schweizer, F.E., 2006. Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 26, 11333-11341.
- Wyss-Coray, T., 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12, 1005-1015.
- Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Naslund, J., Mathews, P.M., Cataldo, A.M., Nixon, R.A., 2005. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.



Zhao, H.G., Li, H.H., Schidthen, A., Neufeld, E.F., 1996. The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6101-6105.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotech.* 15, 871-874.

## Legends to Figures

**Fig. 1.** *Reduced synaptophysin expression and increased GAP43 expression in the rostral cortex of MPSIIIB mice.* Proteins were extracted from the rostral or caudal half of the cortex, or from the cerebellum of wild type (wt) or MPSIIIB mice at 10 days or 8 months of age. At least 3 mice were analysed in each group. Anti-GAP43, anti-synaptophysin (SYP), anti-synaptobrevin (SBV) or anti-actin antibodies bound to western blot membranes were revealed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and enhanced chemiluminescence. **(A)** Example of GAP43, synaptophysin and synaptobrevin western blot signals were shown. **(B)** Light emission by western blot membranes of rostral samples was quantified. Values (means $\pm$ SEM of at least 3 mice) are expressed according to actin signal in the same extracts to account for variations of protein loads. Asterisks indicate significant difference with wild type ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

**Fig. 2.** *GAP43, synaptophysin and synaptobrevin mRNA expression in the MPSIIIB mouse cortex.* mRNAs were extracted from the rostral half of MPSIIIB or wild type mouse cortices at 10 days or 8 months of age. GAP43, synaptophysin (SYP) and synaptobrevin (SBV) cDNA were amplified by real time PCR. ARPO mRNAs were used as internal reference for reverse transcription and amplification (Simpson et al., 2000). Data are expressed as relative mRNA levels ( $2^{-(ct-ctARPO)}$ ). Values are means $\pm$ SEM of 3 (10 days) or 6 (8 months) animals. Asterisk indicates significant difference with wild type ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

**Fig. 3.** *Absence of cortical atrophy and neuronal loss in MPSIIIB mice.* Parasagittal brain sections of 8-month-old wild type (wt) or MPSIIIB mouse brain were immunolabelled for neuronal markers. **(A)** Representative photograph of a MPSIIIB mouse cortex stained with anti-MAP2 antibody (upper panel) and used for the determination of total cortical area and rostral, median and caudal thickness (lower panel). Data are expressed as means $\pm$ SEM of 3 animals per phenotype. **(B)** Representative photograph of a MPSIIIB rostral cortex stained with anti-NeuN antibody (upper panel). The number of

NeuN positive nuclei per section surface unit was expressed as means $\pm$ SEM of 3 animals per phenotype (lower panel). Scale bars: 200  $\mu$ m.

**Fig 4.** *Reduced number of synaptophysin positive puncta in the MPSIIIB mouse rostral cortex.* Parasagittal brain sections of 8 month-old wild type (wt) or MPSIIIB mice were simultaneously immunolabelled for synaptophysin (SYP) and synaptobrevin (SBV). Photographs of the five cortical laminae visible in the rostral cortex were acquired at high magnification with a Leica SP5 confocal system. The same fields labelled either for SYP, for SBV, or for both markers are shown in the left, median and right panels, respectively. Nuclei were counterstained in blue. Left panels show decreased SYP signal in MPSIIIB, as compared to controls. Median panels show similar SBV signal density in wt and MPSIIIB. The right panel shows reduced co-labelling signals in MPSIIIB. The numbers of SYP or SBV positive puncta were scored in each lamina and expressed per section surface unit. Values are means $\pm$ SEM of dots scored per hundred  $\mu$ m<sup>2</sup>. A minimum surface of 10<sup>4</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup> was scored (in the range of 10<sup>3</sup> dots) for each lamina. Three animals per phenotype were examined. Asterisks indicate significant differences with wild type (\*\*p<0.003, \*p<0.04 Whitney test). Scale bars: 10  $\mu$ m.

**Fig. 5.** *Delivery of NaGlu normalises synaptophysin and GAP43 expression in the MPSIIIB mouse brain.* Western blots from the rostral cortex of wild type (wt), untreated MPSIIIB (MPSIIIB) or MPSIIIB mice treated by the injection of AAV-Naglu vector in the right striatum at the age of 6 weeks (MPSIIIB+NaGlu) are shown. Mice were killed at the age of 5 months. Signals detected in the injected (IL) or non-injected (CL) hemisphere of treated MPSIIIB mice are shown. Anti-GAP43, anti-synaptophysin (SYP) or anti-actin antibodies bound to western blot membranes were revealed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and enhanced chemiluminescence. NaGlu activity was measured in water extracts of each tissue before protein solubilisation for western blot. Data are indicated in the bottom line.

**Fig. 6.** *Reduced synaptophysin expression and increased GAP43 expression are intrinsic alterations of MPSIIIB neurons.* Wild type (wt) or MPSIIIB embryonic mouse cortical neurons were maintained for 12 days in culture before mRNAs extraction for quantitative RT-PCR, protein extraction for western blots or fixation on coverslips for immunolabelling. At the third day of culture, a fraction of MPSIIIB neuron cultures was treated by exposure to a lentivirus vector coding for the human NaGlu cDNA (MPSIIIB+NaGlu). **(A)** Quantitative RT-PCR for GAP43, synaptophysin (SYP) or synaptobrevin (SBV) mRNAs. The ARPO mRNAs were used as internal reverse transcription and amplification controls. Amplification data were expressed as  $2^{(ct-ctARPO)}$ . Values are means $\pm$ SEM of ratios of MPSIIIB to paired control cultures (for each phenotype : GAP43, n=6 separate cultures; synaptophysin, n=3; synaptobrevin, n=3). **(B)** Western blots with anti-GAP43, anti-synaptophysin, anti-synaptobrevin or anti-actin antibodies. Signals were revealed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and enhanced chemiluminescence. Data from one representative cell preparation are shown. **(C)** Cultured cortical neurons were stained with anti-NaGlu, anti-GAP43, anti-synaptophysin or anti-synaptobrevin antibodies and examined by immunofluorescence on a Zeiss Apotome Axioplan2 microscope. Nuclei were counterstained in blue. As previously shown ( [nt et al., 2004](#)), the NaGlu signal was barely detectable in wild type neurons, absent in MPSIIIB neurons and intense in 68 $\pm$ 5% of NaGlu-treated MPSIIIB neurons (n=250 neurons from 2 separate cultures). GAP43, synaptophysin and synaptobrevin signals were quantified in cell soma or neurites, and expressed as ratios of positive to total scored areas. Values are means $\pm$ SEM of ratios calculated from at least 70 neurons per condition from 4 separate mouse cultures (SYP) or 30 neurons per condition from 2 separate mouse cultures (GAP43 and SBV). Asterisks indicate significant differences (\* p<0.05, \*\* p<0.001 Student's t test). Scale bars: 10  $\mu$ m.

**Fig. 7.** *Synaptophysin does not accumulate in lysosomes in cultured MPSIIIB neurons.* Embryonic mouse cortical neurons were maintained for 12 days in culture before fixation, co-immunolabelling with anti-synaptophysin (SYP, in magenta), anti-LAMP1 (in green) and anti-GM130 (red in A and green in B) antibodies and apotome acquisition. Nuclei were counterstained in blue. **(A)** Example of the soma

29

of a MPSIIIB neuron in which few vesicles co-express synaptophysin (SYP) and the lysosomal marker LAMP1 (arrow). **(B)** Example of the soma of two MPSIIIB neurons one of which contains saccules that co-expresses SYP and the cis-Golgi marker GM130 (arrow). Colocalisation coefficients were determined with ImageJ and Axiovision softwares in wild type (wt) and MPSIIIB neurons. Synaptophysin and LAMP1 colocalisation coefficients were scored in areas negative for GM130, exclusively. Colocalisation coefficients were expressed relative to the synaptophysin signal, the LAMP1 signal or the GM130 signal. Values are means $\pm$ SEM of colocalisation coefficients scored on a minimum of 40 neurons per condition from 3 individual mouse cultures. Asterisks indicate significant differences (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , Student's t test). Scale bars: 10  $\mu$ m.

**Fig. 8. Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in MPSIIIB neurons.** Wild type (wt) or MPSIIIB embryonic mouse cortical neurons were maintained for 8 days in culture before treatment with drugs or vehicle (DMSO) and subsequent immunolabeling or protein extraction. At the third day of culture, a fraction of MPSIIIB neuron cultures was exposed to a lentivirus vector coding for the human NaGlu cDNA (MPSIIIB+NaGlu). **(A)** Synaptophysin expression increased in MPSIIIB neurons treated with MG132. After 4 hours of incubation with the indicated concentration of MG132, neurons were fixed, stained with anti-synaptophysin antibodies and examined by immunofluorescence on an apotome microscope. Nuclei were counterstained in blue. The synaptophysin signal was scored in somatic and neuritic areas and expressed as the ratio of synaptophysin positive to total scored area. Values are means $\pm$ SEM of ratios from at least 40 neurons per condition from 3 separate cultures (DMSO : n=108 for wt, n=93 for MPSIIIB, n=41 for MPSIIIB+NaGlu ; 5  $\mu$ g/ml MG132 : n=60 for wt, n=48 for MPSIIIB, n=41 for MPSIIIB+NaGlu ; 10  $\mu$ g/ml MG132 : n=57 for wt, n=69 for MPSIIIB, n=46 for MPSIIIB+NaGlu). **(B)** Wild type levels of synaptophysin were recovered in MPSIIIB neurons in the presence of MG132. After 4 hours in the presence of MG132 (10  $\mu$ g/ml), neurons were lysed for protein extraction and western blotting with anti-GAP43, anti-synaptophysin (SYP) or anti-actin antibodies. Membranes were revealed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and enhanced chemiluminescence. Signals in untreated neurons are shown in Fig 6B. **(C)** Lactacystin

30

but not leupeptin increased synaptophysin expression in MPSIIIB neurons. Mutant neurons were incubated with lactacystin (Lact., 2.5  $\mu$ M, 4 hours) or with leupeptin (Leup., 50  $\mu$ M, 48 hours) before fixation and immunolabeling for synaptophysin. The synaptophysin signal was scored in neuronal soma. Values are means $\pm$ SEM of ratios of synaptophysin positive to total scored area (n=105 for DMSO, n=68 for Lactacystin and n=37 for Leupeptine). Asterisks indicate significant difference between wild type and MPSIIIB neurons in the same condition (\* p<0.05, Student's t test). Crosses indicate significant difference between untreated (DMSO) and treated MPSIIIB neurons ( $\dagger$  p<0.001, Student's t test). Scale bars: 10  $\mu$ m.

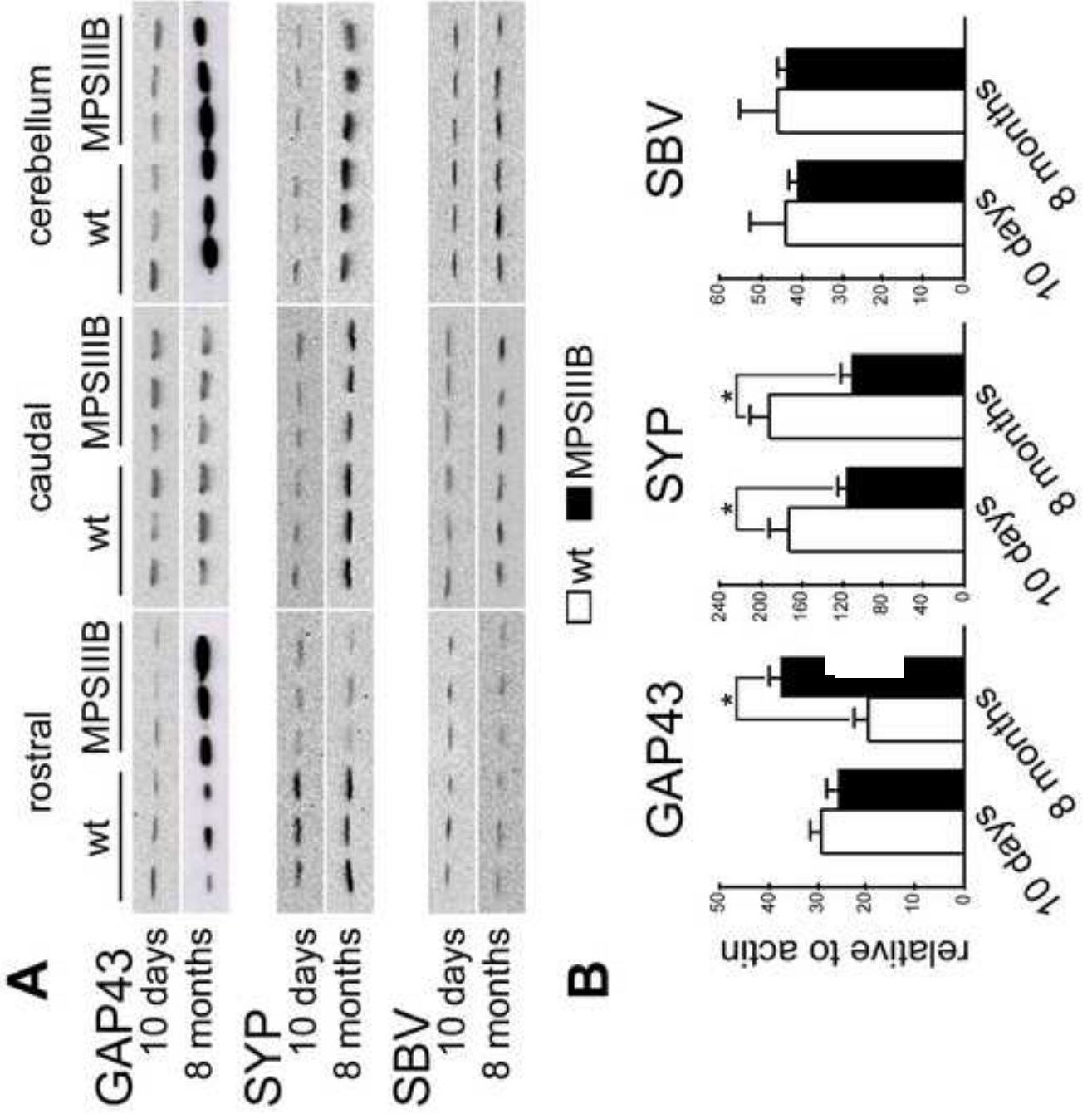


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

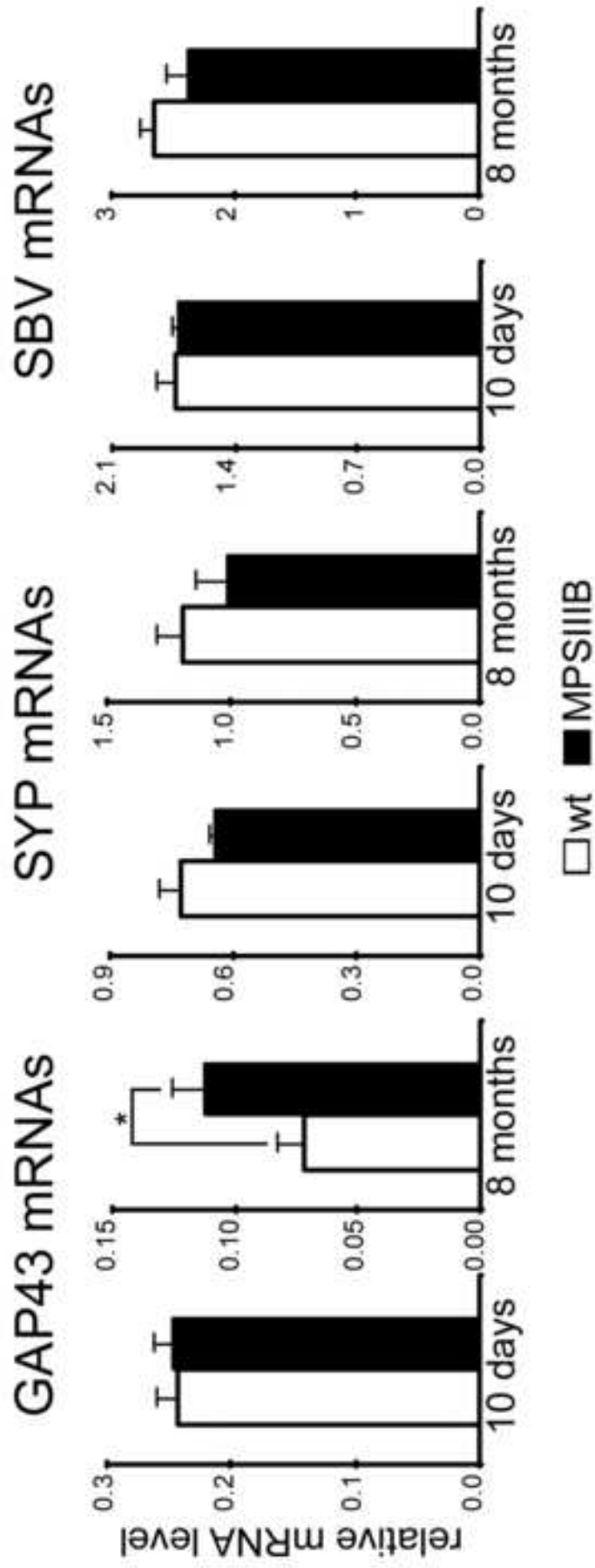
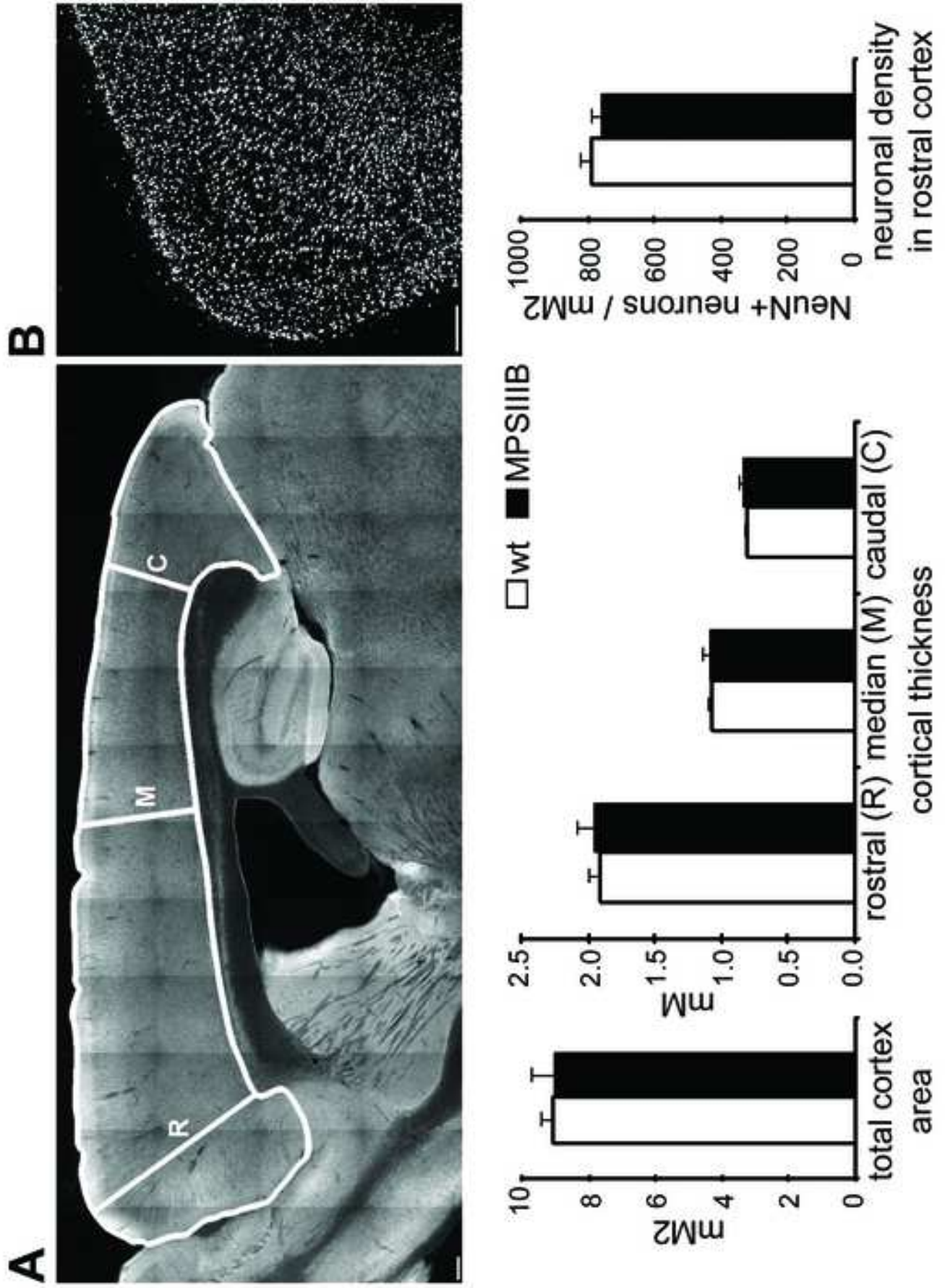




Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



**Figure**  
[Click here to download high resolution image](#)

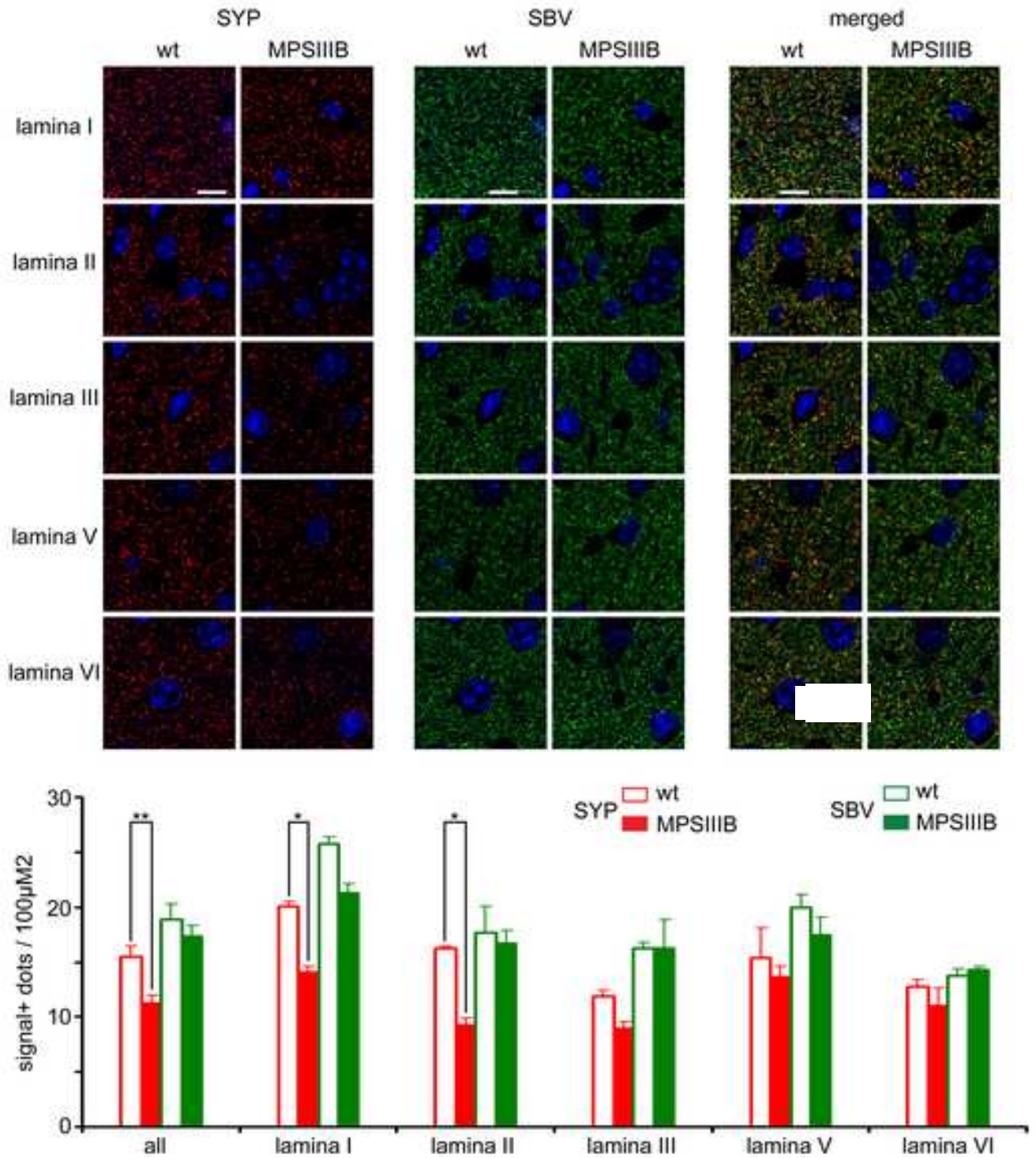


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

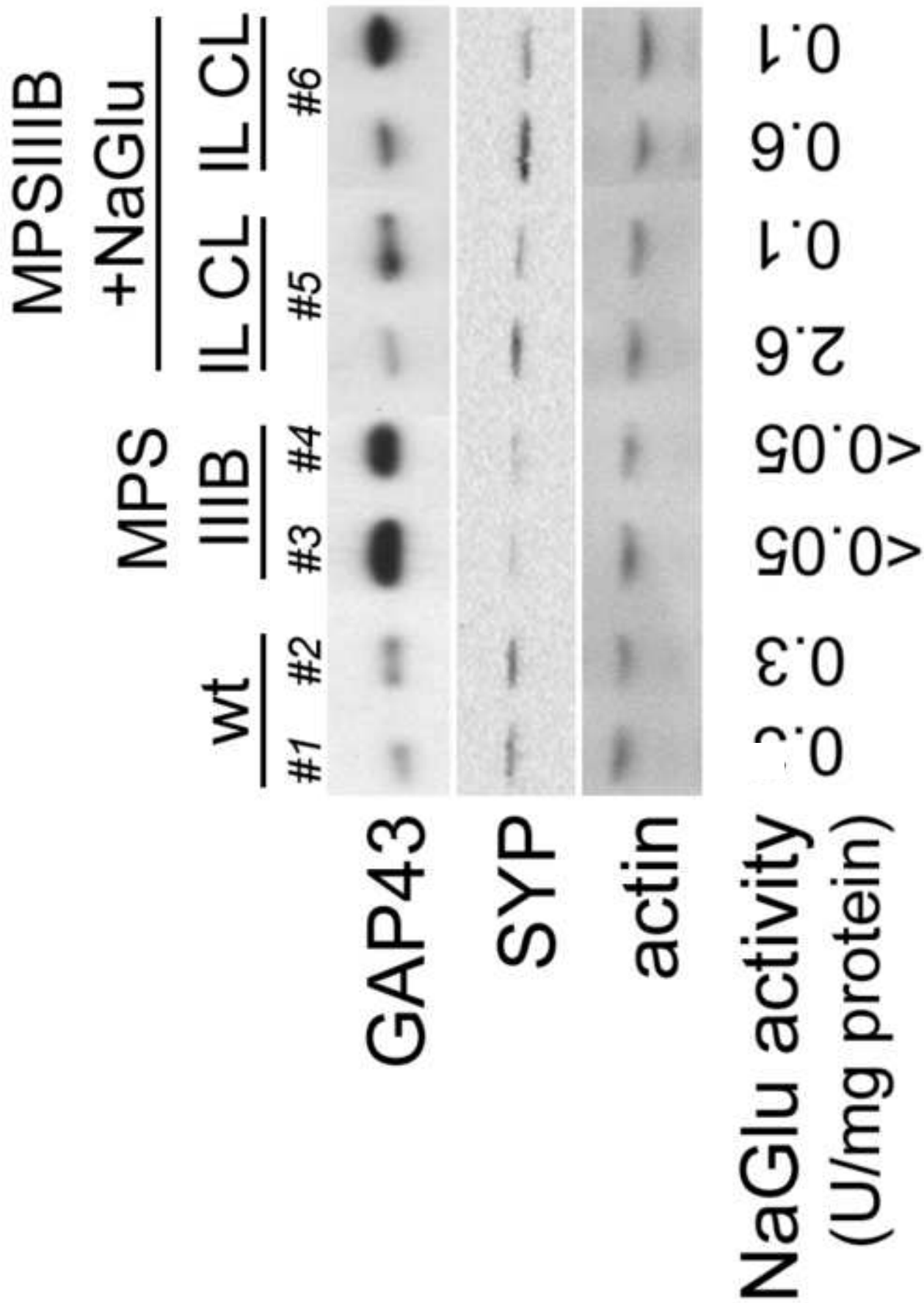




Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

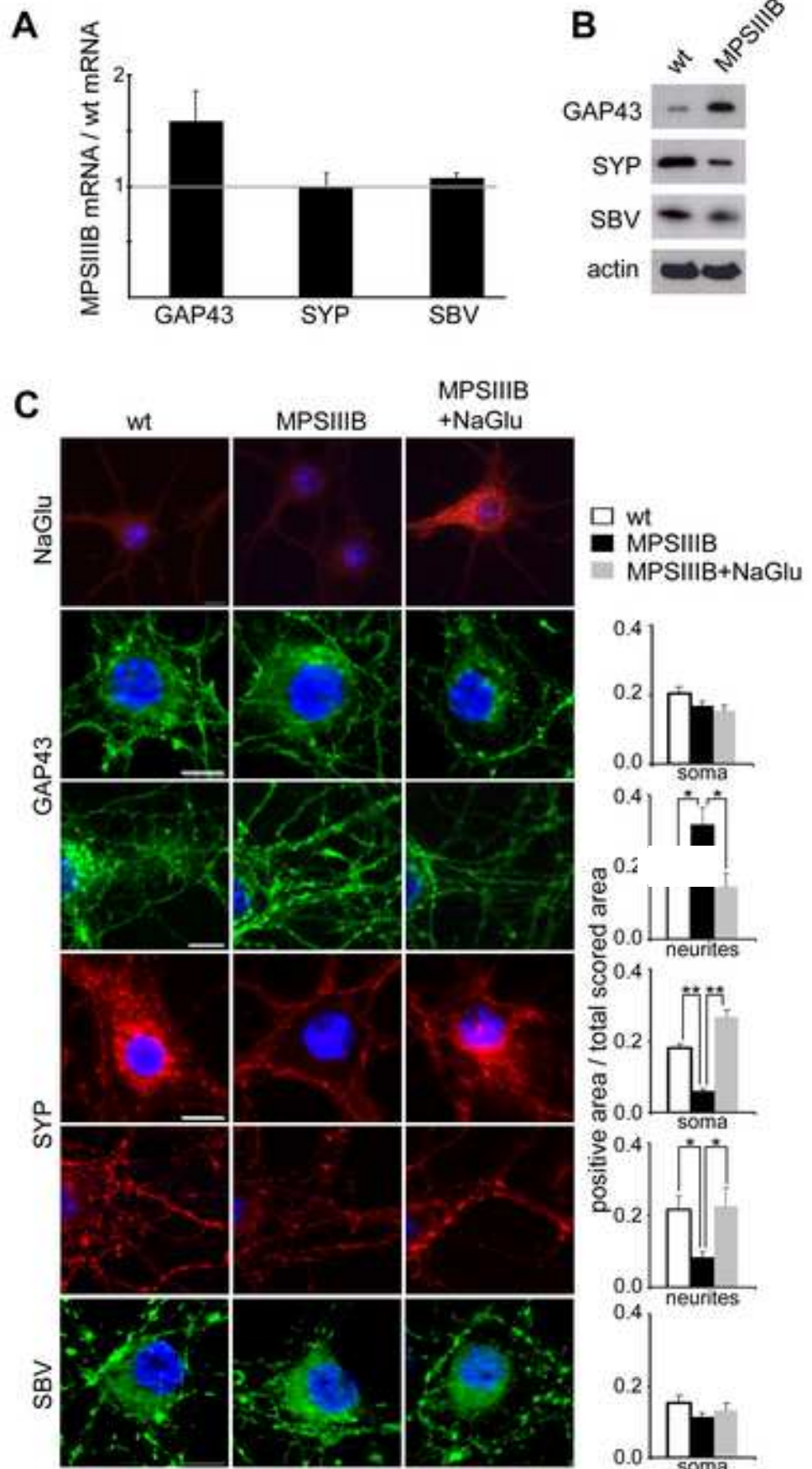


Figure [Click here to download high resolution image](#)

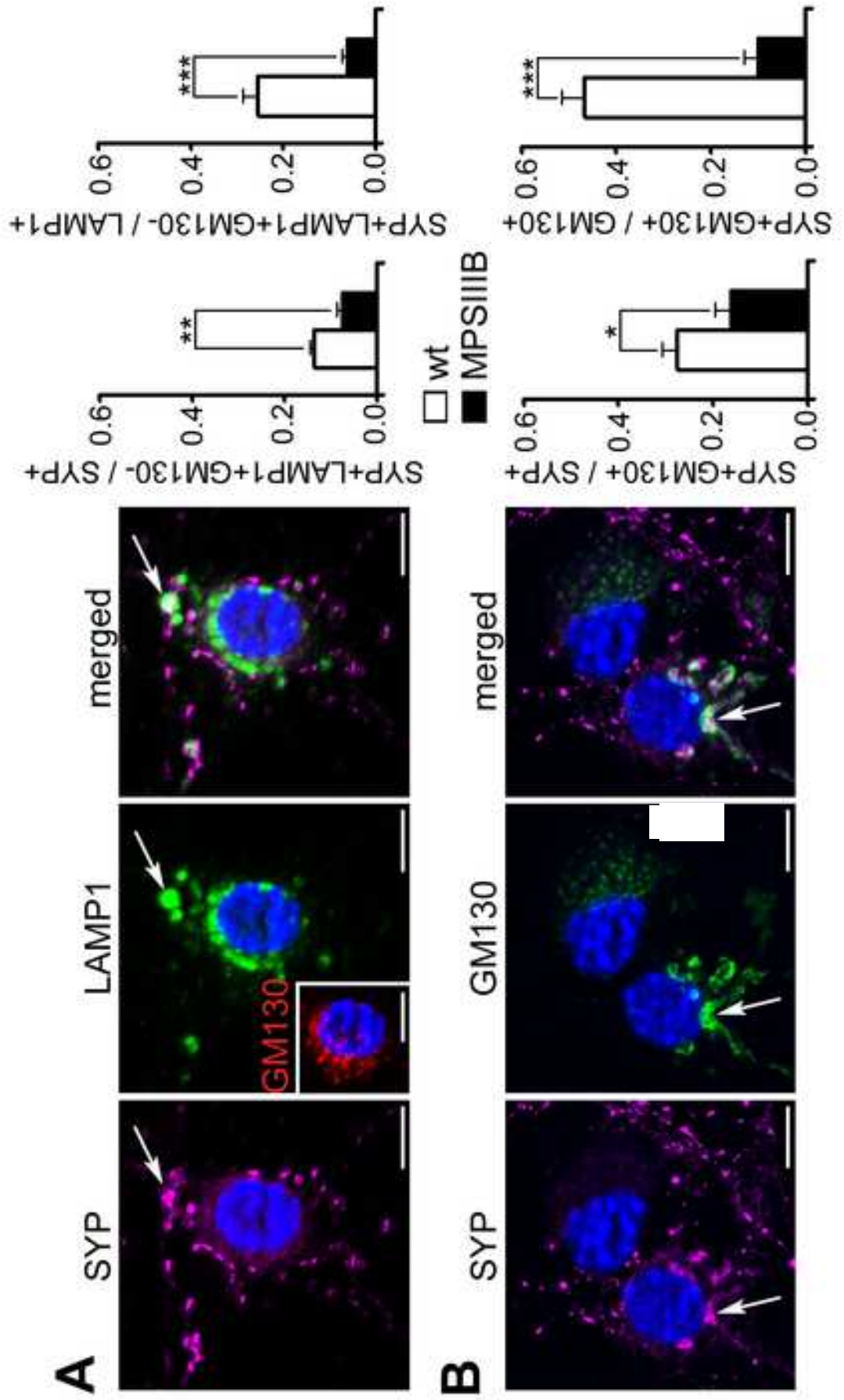
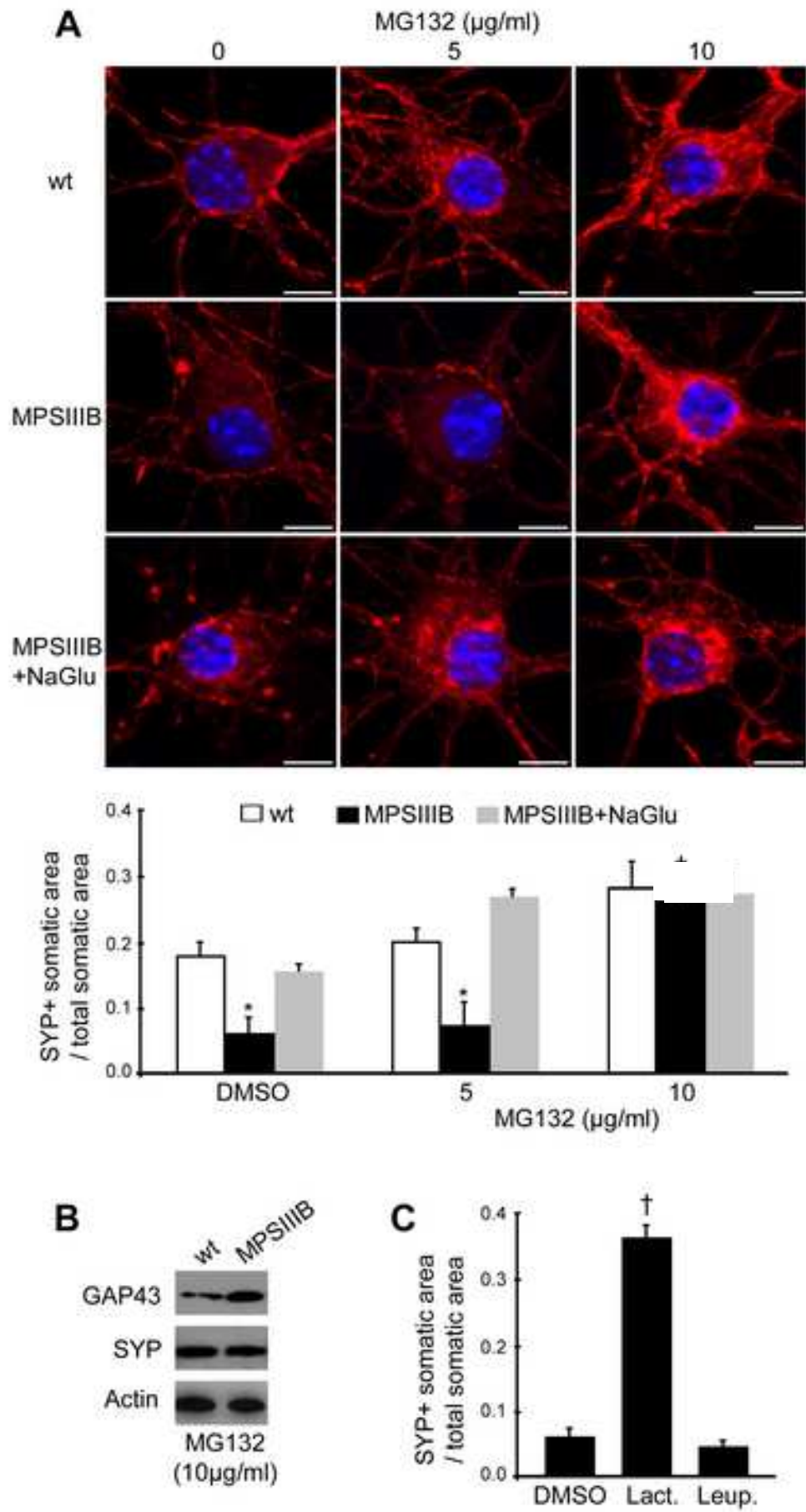


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



- **BIBLIOGRAFIA** -

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed., Garland Publishing, New York.
- Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI and Gerson SL (1997) LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 8: 1417–1427.
- Anson DS, Bielicki J, Hopwood JJ (1992) Correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by retroviral-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase gene. *Hum Gene Ther* 3:371-379.
- Ashton LJ, Brooks DA, McCourt PA, Muller VJ, Clements PR, Hopwood JJ (1992) Immunoquantification and enzyme kinetics of alpha-L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. *Am J Hum Genet* 50:787-794.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S and Zeiher AM (2002) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction—(TOPCARE-AMI). *Circulation* 106: 3009–3017.
- Avila JL, Convit J (1975) Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem J* 152:57-64.
- Badiavas EV and Falanga V (2003) Treatment of chronic wounds with bone marrow–derived cells. *Arch Dermatol* 139: 510–516.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267-1290.
- Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth SA, Chang PL (2003) Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med* 142:399-413.
- Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC, Samulski RJ (1999) Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol* 17:181-186.
- Baxter MA, Wynn RF, Deakin JA, Bellantuono I, Edington KG, Cooper A, Besley GT, Church HJ, Wraith JE, Carr TF, Fairbairn LJ (2002) Retrovirally mediated correction of bone marrow–derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood* 99: 1857-1859.
- Beck M (2001) Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 24 Suppl 2:47-51; discussion 45-46.
- Belichenko PV, Dickson PI, Passage M, Jungles S, Mobley WC and Kakkis ED (2005) Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human alpha-L-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain. *Mol Genet Metab* 86:141-149.



- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68: 729.
- Bielicki J, Crawley AC, Davey RC, Varnai JC, Hopwood JJ (1999) Advantages of using same species enzyme for replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *J Biol Chem* 274:36335-36343.
- Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, Sessa M, Fasano S, Brambilla R, Marchesini S, Bordignon C, Naldini L (2004) Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 113:1118-1129.
- Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, Johnson L, Dobrenis K, Bhattacharyya R, Wurzelmann S, Finamore P, Hopwood JJ, Walkley SU, Stanley P (1999) A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology* 9:1389-1396.
- Bornemann DJ, Duncan JE, Staatz W, Selleck S, Warrior R (2004) Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development* 131:1927-1938.
- Bovolenta P, Feraud-Espinosa I (2000) Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* 61:113-132.
- Brante G (1952) Gargoylism: a mucopolysaccharidosis. *Scand J Clin Lab Invest* 4:43.
- Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ and Krivit W (2003) Usefulness of bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. *Am J Cardiol* 92:882-886.
- Brickman YG, Ford MD, Gallagher JT, Nurcombe V, Bartlett PF, Turnbull JE (1998) Structural modification of fibroblast growth factor-binding heparan sulfate at a determinative stage of neural development. *J Biol Chem* 273:4350-4359.
- Brooks AI, Stein CS, Hughes SM, Heth J, McCray PM, Jr., Sauter SL, Johnston JC, Cory-Slechta DA, Federoff HJ, Davidson BL (2002) Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6216-6221.
- Brooks DA (1999) Immune response to enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorder patients and animal models. *Mol Genet Metab* 68:268-275.
- Brooks DA, Kakavanos R, Hopwood JJ (2003) Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med* 9:450-453.
- Brooks DA, King BM, Crawley AC, Byers S, Hopwood JJ (1997) Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI: evidence for immune

responses and altered efficacy of treatment in animal models. *Biochim Biophys Acta* 1361:203-216.

Bruder SP, Fink DJ and Caplan AI (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56:283–294.

Byers S, Nuttall JD, Crawley AC, Hopwood JJ, Smith K, Fazzalari NL (1997) Effect of enzyme replacement therapy on bone formation in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *Bone* 21:425-431.

Camassola M, Braga LM, Delgado-Canedo A, Dalberto TP, Matte U, Burin M, Giugliani R, Nardi NB (2005) Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. *J Inherit Metab Dis* 28:1035-1043.

Chang MH, Bindloss CA, Grabowski GA, Qi X, Winchester B, Hopwood JJ, Meikle PJ (2000) Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 46:167-174.

Clarke LA, Russell CS, Pownall S, Warrington CL, Borowski A, Dimmick JE, Toone J, Jirik FR (1997) Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet* 6:503-511.

Constantopoulos G, Dekaban AS (1978) Neurochemistry of the mucopolysaccharidoses: brain lipids and lysosomal enzymes in patients with four types of mucopolysaccharidosis and in normal controls. *J Neurochem* 30:965-973.

Crawley AC, Brooks DA, Muller VJ, Petersen BA, Isaac EL, Bielicki J, King BM, Boulter CD, Moore AJ, Fazzalari NL, Anson DS, Byers S, Hopwood JJ (1996) Enzyme replacement therapy in a feline model of Maroteaux-Lamy syndrome. *J Clin Invest* 97:1864-1873.

Crawley AC, Niedzielski KH, Isaac EL, Davey RC, Byers S, Hopwood JJ (1997) Enzyme replacement therapy from birth in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. *J Clin Invest* 99:651-662.

Cuervo AM and Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273:501-503.

Daly TM, Vogler C, Levy B, Haskins ME, Sands MS (1999) Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2296-2300.

D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJ, Robinson D, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4535-4539.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P and Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928–1942.

- Deglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11:179-190.
- Desmaris N, Verot L, Puech JP, Caillaud C, Vanier MT and Heard JM (2004) Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol* 56:68-76.
- Desnick RJ, Schuchman EH (2002) Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet* 3:954-966.
- Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM and Balian G (2000) Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 16: 571-577.
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA and Schiller PC (2004) Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117:2971-2981.
- Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R, von Figura K (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci* 112 (Pt 10):1591-1597.
- Downs-Kelly E, Jones MZ, Alroy J, Cavanagh KT, King B, Lucas RE, Baker JC, Kraemer SA, Hopwood JJ (2000) Caprine mucopolysaccharidosis IIID: a preliminary trial of enzyme replacement therapy. *J Mol Neurosci* 15:251-262.
- Drickamer K (1991) Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 67:1029-1032.
- El-Aneed A (2004) Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 498:1-8.
- Eto Y, Ohashi T (2000) Gene therapy/cell therapy for lysosomal storage disease. *J Inherit Metab Dis* 23:293-298.
- Fouillard L, Bensedhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A and Gorin NC (2003) Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17: 474-476.
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1968) Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* 162:570-572.
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF (1969) The defect in Hurler and Hunter syndromes. II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:360-366.

- Fuller M, Brooks DA, Evangelista M, Hein LK, Hopwood JJ and Meikle PJ (2005) Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. *Mol Genet Metab* 84:18-24.
- Funato K, Beron W, Yang CZ, Mukhopadhyay A, Stahl PD (1997) Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J Biol Chem* 272:16147-16151.
- Furst W, Sandhoff K (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta* 1126:1-16.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M and Caplan AI (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12–20.
- German DC, Liang CL, Song T, Yazdani U, Xie C, Dietschy JM (2002) Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109:437-450.
- Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:202-212.
- Gieselmann V (1995) Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* 1270:103-136.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN and Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9:589-595.
- Ginsberg SD, Galvin JE, Lee VM, Rorke LB, Dickson DW, Wolfe JH, Jones MZ, Trojanowski JQ (1999) Accumulation of intracellular amyloid-beta peptide (A beta 1-40) in mucopolysaccharidosis brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:815-824.
- Glew RH, Basu A, Prenc EM, Remaley AT (1985) Lysosomal storage diseases. *Lab Invest* 53:250-269.
- Gomez-Pinilla F, Miller S, Choi J, Cotman CW (1997) Heparan sulfate potentiates the autocrine action of basic fibroblast growth factor in astrocytes: an in vivo and in vitro study. *Neuroscience* 76:137-145.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219-240.
- Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, Coryell JC, Nguyen TM, Nardocci N, Zorzi G, Rodriguez D, Desguerre I, Bertini E, Simonati A, Levinson B, Dias C, Barbot C, Carrilho I, Santos M, Malik I, Gitschier J, Hayflick SJ (2008) Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase (A2). *Neurology* 71:1402-1409.

- Guffon N, Souillet G, Maire I, Straczek J, Guibaud P (1998) Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation. *J Pediatr* 133:119-125.
- Harper (1998) Bioquímica. In: Murray RK and Kelley FW (eds) *A matriz extracelular*. 8ª ed. Manole, São Paulo pp 667-685.
- Hartung SD, Frandsen JL, Pan D, Koniar BL, Graupman P, Gunther R, Low WC, Whitley CB and Mclvor RS (2004) Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human alpha-L-iduronidase gene. *Mol Ther* 9:866-875.
- Hawkes C, Kar S (2004) The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 44:117-140.
- Hers (1965) Inborn lysosomal diseases. *Gastroenterology* 48:625-633.
- Hochuli M, Wuthrich K, Steinmann B (2003) Two-dimensional NMR spectroscopy of urinary glycosaminoglycans from patients with different mucopolysaccharidoses. *NMR Biomed* 16:224-236.
- Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni P, Ringden O, Kapaun P, Ortega JJ, O'Meara A, Cornu G, Souillet G, Frappaz D, et al. (1995) Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation. *Lancet* 345:1398-1402.
- Hopwood JJ, Morris CP (1990) The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* 7:381-404.
- Hopwood JJ and Brooks DA (1997) An introduction to the basic science and biology of the lysosome and storage diseases. In: *Organelle Diseases. Clinical Features, Diagnosis, Pathogenesis and Management*. Applegarth, D.A., Dimmick, J.E., and Hall, J.G. (eds.). Chapman and Hall Medical, London, pp. 7.
- Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ, Meikle PJ (1998) Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 44:2094-2102.
- Huang MM, Wong A, Yu X, Kakkis E and Kohn DB (1997) Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. *Gene Ther* 4:1150-1159.
- Hultberg B, Isaksson A, Sjoblad S, Ockerman PA (1980) Acid hydrolases in serum from patients with lysosomal disorders. *Clin Chim Acta* 100:33-38.
- Hunter C (1917) A rare disease in two brothers. *Proc Roy Soc Med* 10:104-115.

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA and Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41–49.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow–derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238: 265–272.
- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF and Kassem M (2002) Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 71: 36–44.
- Kakavanos R, Turner CT, Hopwood JJ, Kakkis ED, Brooks DA (2003) Immune tolerance after long-term enzymereplacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. *Lancet* 361:1608-1613.
- Kakkis ED, McEntee MF, Schmidtchen A, Neufeld EF, Ward DA, Gompf RE, Kania S, Bedolla C, Chien SL, Shull RM (1996) Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem Mol Med* 58:156-167.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF (2001a) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 344:182-188.
- Kakkis ED, Schuchman E, He X, Wan Q, Kania S, Wiemelt S, Hasson CW, O'Malley T, Weil MA, Aguirre GA, Brown DE, Haskins ME (2001b) Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* 72:199-208.
- Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S and Passage M (2004) Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab* 83:163-174.
- Karageorgos LE, Isaac EL, Brooks DA, Ravenscroft EM, Davey R, Hopwood JJ, Meikle PJ (1997) Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders. *Exp Cell Res* 234:85-97.
- Kasper D, Dittmer F, von Figura K, Pohlmann R (1996) Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol* 134:615-623.
- Kassem M (2004) Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications. *Cloning Stem Cells* 6:369-374.
- Kassem M, Mosekilde L and Eriksen EF (1993) 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of

- human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Min Res* 8: 1453–1458.
- Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM and Krivit W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30: 215–222.
- Kolset SO, Salmivirta M (1999) Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci* 56:857-870.
- Kopen GC, Prockop DJ and Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10711-10716.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290:767-773.
- Kornfeld S (1986) Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77:1-6.
- Kornfeld S (1987) Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J* 1:462-468.
- Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5:483-525.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
- Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J and Shapiro EG (1995) The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis* 18:398-412.
- Krivit W, Shapiro EG, Peters C, Wagner JE, Cornu G, Kurtzberg J, Wenger DA, Kolodny EH, Vanier MT, Loes DJ, Dusenbery K, Lockman LA (1998) Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy. *N Engl J Med* 338:1119-1126.
- Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, Peters C (1999) Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol* 6:377-382.
- Kucia M, Reca R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J and Ratajczak MZ (2005) Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 19:1118-1127.

- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P and Robey PG (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153: 1133–1140.
- Lakshmipathy U and Verfaillie C (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev* 19:29-38.
- Lawrence BP and Brown WJ (1992) Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J Cell Sci* 102 ( Pt 3):515-526.
- Lee J, S Kuroda, H Shichinohe, J Ikeda, T Seki, K Hida, M Tada, K Sawada and Y Iwasaki. (2003). Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 23:169–180.
- Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, Fanselow MS, Suzuki K, Vanier MT, Neufeld EF (1999) Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14505-14510.
- Liaw PC, Becker DL, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI (2001) Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin cofactor ii in the presence of dermatan sulfate but not heparin. *J Biol Chem* 276:20959-20965.
- Liu G, Martins I, Wemmie JA, Chiorini JA and Davidson BL (2005a) Functional correction of CNS phenotypes in a lysosomal storage disease model using adeno-associated virus type 4 vectors. *J Neurosci* 25:9321-9327.
- Liu Y, Xu L, Hennig AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Mosinger OJ, Cai SR and Parker PK (2005b) Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther* 11:35-47.
- Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L and Tubo R (2002) Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 8: 739–751.
- Ludwig T, Ovitt CE, Bauer U, Hollinshead M, Remmler J, Lobel P, Ruther U, Hoflack B (1993) Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes. *Embo J* 12:5225-5235.
- Maire I (2001) Is genotype determination useful in predicting the clinical phenotype in lysosomal storage diseases? *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2:57-61; discussion 45-56.
- Malatack JJ, Consolini DM, Bayever E (2003) The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29:391-403.
- Marechal V, Naffakh N, Danos O, Heard JM (1993) Disappearance of lysosomal storage in spleen and liver of mucopolysaccharidosis VII mice after



- transplantation of genetically modified bone marrow cells. *Blood* 82:1358-1365.
- Margolis RK and Margolis RU (1994) Nervous tissue proteoglycans. *Exs* 70:145-177.
- Markello TC, Bernardini IM, Gahl WA (1993) Improved renal function in children with cystinosis treated with cysteamine. *N Engl J Med* 328:1157-1162.
- Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS (1995) A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* 131:351-369.
- Marzella L and Glaumann H (1983) Biogenesis, translocation, and function of lysosomal enzymes. *Int Rev Exp Pathol* 25:239-278.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.
- Meikle PJ, Brooks DA, Ravenscroft EM, Yan M, Williams RE, Jaunzems AE, Chataway TK, Karageorgos LE, Davey RC, Boulter CD, Carlsson SR, Hopwood JJ (1997) Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* 43:1325-1335.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281:249-254.
- Meirelles LS and Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123:702-711.
- Meng XL, Shen JS, Ohashi T, Maeda H, Kim SU and Eto Y (2003) Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J Neurosci Res* 74:266-277.
- Méresse S, Bauer U, Ludwig T, Mauxion F, Schmidt A, Hoflack B (1993) Bases moléculaires du transport vers les lysosomes. *Médecine/Science* 9:148-156.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG and Shi S (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5807–5812.
- Munier-Lehmann H, Mauxion F, Bauer U, Lobel P, Hoflack B (1996) Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 271:15166-15174.

- Nardi NB (2005) All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. *Med Hypotheses* 64: 811–817.
- Nelson J (1997) Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet* 101:355-358.
- Neufeld EF, Fratantoni JC (1970) Inborn errors of mucopolysaccharide metabolism. *Science* 169:141-146.
- Neufeld EF and Cantz MJ (1971) Corrective factors for inborn errors of mucopolysaccharide metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 179:580-587.
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. Edition (C.R. Scriver ALB, W. S. Sly, D. Valle, ed), pp 3421-3452. New York: McGraw-Hill.
- Niyibizi C, S Wang, Z Mi, Robbins, PD (2004). The fate of mesenchymal stem cells transplanted into immunocompetent neonatal mice: implications for skeletal gene therapy via stem cells. *Mol Ther* 9:955-963.
- Noda T and Farquhar MG (1992) A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J Cell Biol* 119:85-97.
- Nurcombe V, Ford MD, Wildschut JA, Bartlett PF (1993) Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* 260:103-106.
- O'Connor LH, Erway LC, Vogler CA, Sly WS, Nicholes A, Grubb J, Holmberg SW, Levy B, Sands MS (1998) Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function. *J Clin Invest* 101:1394-1400.
- Ohashi T, Yokoo T, Iizuka S, Kobayashi H, Sly WS, Eto Y (2000) Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of normal and genetically modified macrophages. *Blood* 95:3631-3633.
- Ohgushi H, Goldberg VM and Caplan AI (1989) Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 60:334–339.
- Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1902-1907.
- Pan C, Nelson MS, Reyes M, Koodie L, Brazil JJ, Stephenson EJ, Zhao RC, Peters C, Selleck SB, Stringer SE and Gupta P (2005) Functional abnormalities of heparan sulfate in mucopolysaccharidosis-I are associated with defective biologic activity of FGF-2 on human multipotent progenitor cells. *Blood* 106:1956-1964.

- Passini MA, Watson DJ, Vite CH, Landsburg DJ, Feigenbaum AL, Wolfe JH (2003) Intraventricular Brain Injection of Adeno-Associated Virus Type 1 (AAV1) in Neonatal Mice Results in Complementary Patterns of Neuronal Transduction to AAV2 and Total Long-Term Correction of Storage Lesions in the Brains of beta-Glucuronidase-Deficient Mice. *J Virol* 77:7034-7040.
- Pastores GM, Sibille AR, Grabowski GA (1993) Enzyme therapy in Gaucher disease type 1: dosage efficacy and adverse effects in 33 patients treated for 6 to 24 months. *Blood* 82:408-416.
- Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M, Gallo RL (1998) Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem* 273:28116-28121.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O and Prockop DJ (1995) Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4857-4861.
- Petaja J, Fernandez JA, Gruber A, Griffin JH (1997) Anticoagulant synergism of heparin and activated protein C in vitro. Role of a novel anticoagulant mechanism of heparin, enhancement of inactivation of factor V by activated protein C. *J Clin Invest* 99:2655-2663.
- Peters C, Rommerskirch W, Modaressi S, von Figura K (1991) Restoration of arylsulphatase B activity in human mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts by retroviral-vector-mediated gene transfer. *Biochem J* 276 ( Pt 2):499-504.
- Peters C, Shapiro EG, Krivit W (1998a) Neuropsychological development in children with Hurler syndrome following hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2:250-253.
- Peters C, Shapiro EG, Krivit W (1998b) Hurler syndrome: past, present, and future. *J Pediatr* 133:7-9.
- Peters C, Balthazor M, Shapiro EG, King RJ, Kollman C, Hegland JD, Henslee-Downey J, Trigg ME, Cowan MJ, Sanders J, Bunin N, Weinstein H, Lenarsky C, Falk P, Harris R, Bowen T, Williams TE, Grayson GH, Warkentin P, Sender L, Cool VA, Crittenden M, Packman S, Kaplan P, Lockman LA, Anderson J, Krivit W, Dusenbery K and Wagner J (1996) Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood* 87:4894-4902.
- Pfeifer A and Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177-211.
- Pisoni RL, Thoene JG (1991) The transport systems of mammalian lysosomes. *Biochim Biophys Acta* 1071:351-373.

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105:151-156.
- Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT (1998) Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 273:22936-22942.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a coreceptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5:71-77.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E and Marcacci M (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385–386.
- Rabenstein DL (2002) Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19:312-331.
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252:1705-1708.
- Ratajczak MZ, Kucia M, Majka M, Reza R and Ratajczak J (2004) Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol* 42:139-46.
- Renfrew CA and Hubbard AL (1991) Degradation of epidermal growth factor receptor in rat liver. Membrane topology through the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 266:21265-21273.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L and Verfaillie CM (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.
- Rijnboutt S, Kal AJ, Geuze HJ, Aerts H, Strous GJ (1991) Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem* 266:23586-23592.
- Rolny C, Spillmann D, Lindahl U, Claesson-Welsh L (2002) Heparin amplifies platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-induced PDGF alpha-receptor but not PDGF beta-receptor tyrosine phosphorylation in heparan sulfate-deficient cells. Effects on signal transduction and biological responses. *J Biol Chem* 277:19315-19321.
- Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P and Kassem M (2003) The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int* 72:135–142.

- Rosenberg M, Kingma W, Fitzpatrick MA, Richards SM (1999) Immunosurveillance of alglucerase enzyme therapy for Gaucher patients: induction of humoral tolerance in seroconverted patients after repeat administration. *Blood* 93:2081-2088.
- Rostand KS and Esko JD (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* 65:1-8.
- Rubanyi GM (2001) The future of human gene therapy. *Mol Aspects Med* 22:113-142.
- Rudge JS and Silver J (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* 10:3594-3603.
- Ruoslahti E and Yamaguchi Y (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867-869.
- Russell C, Hendson G, Jevon G, Matlock T, Yu J, Aklujkar M, Ng KY, Clarke LA (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 53:349-361.
- Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, Suter A, von Figura K (2000) Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol* 477:293-303.
- Sakakihara Y, Imabayashi T, Suzuki Y, Kamoshita S (1994) Elevated levels of dolichol in the brains of mucopolysaccharidosis and related disorders. *Mol Chem Neuropathol* 22:97-103.
- Saksela O, Rifkin DB (1990) Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110:767-775.
- Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* 10:1270-1279.
- Sampson JH, Akabani G, Archer GE, Bigner DD, Berger MS, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE 2nd, Kunwar S, Marcus S, McLendon RE, Paolino A, Penne K, Provenzale J, Quinn J, Reardon DA, Rich J, Stenzel T, Tourt-Uhlig S, Wikstrand C, Wong T, Williams R, Yuan F, Zalutsky MR and Pastan I (2003) Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neuro-Oncol* 65: 27–35.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR and Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247–256.

- Sando GN and Neufeld EF (1977) Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme, alpha-l-iduronidase, by cultured human fibroblasts. *Cell* 12:619-627.
- Sands MS, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Sly WS, Birkenmeier EH (1994) Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII. *J Clin Invest* 93:2324-2331.
- Sands MS, Vogler C, Torrey A, Levy B, Gwynn B, Grubb J, Sly WS, Birkenmeier EH (1997) Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 99:1596-1605.
- Sands MS, Vogler CA, Ohlemiller KK, Roberts MS, Grubb JH, Levy B, 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* 276:43160-43165.
- Sasisekharan R and Venkataraman G (2000) Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* 4:626-631.
- Saudubray, JM & Charpentier, C - Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver, CR, Beaudet, L, Sly, WS and Valle, D *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, chapter 5, pp. 327-400, 1995.
- Schlessinger J, Lax I, Lemmon M (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 83:357-360.
- Schmidtchen A, Frick IM, Bjorck L (2001) Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol* 39:708-713.
- Schwartz IVD, Matte US, Leistner S and Giugliani R (2001) Mucopolissacaridoses. In: *Doenças genéticas em pediatria*, 1a edn (Carakushansky G, ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: pp180-184.
- Seto T, Kono K, Morimoto K, Inoue Y, Shintaku H, Hattori H, Matsuoka O, Yamano T, Tanaka A (2001) Brain magnetic resonance imaging in 23 patients with mucopolysaccharidoses and the effect of bone marrow transplantation. *Ann Neurol* 50:79-92.
- Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ and Neufeld EF (1994) Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12937-12941.
- Sleat DE and Lobel P (1997) Ligand binding specificities of the two mannose 6-phosphate receptors. *J Biol Chem* 272:731-738.
- Smith KR (2003) Gene therapy: theoretical and bioethical concepts. *Arch Med Res* 34:247-268.

- Staba SL, Escolar ML, Poe M, Kim Y, Martin PL, Szabolcs P, Allison-Thacker J, Wood S, Wenger DA, Rubinstein P, Hopwood JJ, Krivit W, Kurtzberg J (2004) Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med* 350:1960-1969.
- Stein CS, Kang Y, Sauter SL, Townsend K, Staber P, Derksen TA, Martins I, Qian J, Davidson BL and McCray PB Jr (2001) In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:850-856.
- Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A, von Figura K (1987) Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *Embo J* 6:2677-2681.
- Stanworth SJ and Newland AC (2001) Stem cells: progress in research and edging towards the clinical setting. *Clin Med* 1: 378-382.
- Stewart K, Brown OA, Morelli AE, Fairbairn LJ, Lashford LS, Cooper A, Hatton CE, Dexter TM, Castro MG, Lowenstein PR (1997) Uptake of alpha-(L)-iduronidase produced by retrovirally transduced fibroblasts into neuronal and glial cells in vitro. *Gene Ther* 4:63-75.
- Stringer SE and Gallagher JT (1997) Heparan sulphate. *Int J Biochem Cell Biol* 29:709-714.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.
- Summerford C and Samulski RJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-1445.
- Tal J (2000) Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *J Biomed Sci* 7:279-291.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T and Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435.
- Toma L, Dietrich CP, Nader HB (1996) Differences in the nonreducing ends of heparan sulfates excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: a new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. *Lab Invest* 75:771-781.
- Trowbridge JM, Gallo RL (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 12:117R- 125R.

- Turnbull J, Powell A, Guimond S (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 11:75-82.
- Turner CT, Hopwood JJ, Bond CS, Brooks DA (1999) Immune response to enzyme replacement therapy: 4-sulfatase epitope reactivity of plasma antibodies from MPS VI cats. *Mol Genet Metab* 67:194-205.
- Van Gerpen JA, Wider C, Broderick DF, Disckson DW, Brown LA, Wszolek ZK (2008) Insights into the dynamics of hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids. *Neurology* 71:925-929.
- Vellodi A, Young EP, Cooper A, Wraith JE, Winchester B, Meaney C, Ramaswami U and Will A (1997) Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Arch Dis Child* 76:92-99.
- Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE (1999) Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inherit Metab Dis* 22:638-648.
- Verma IM and Somia N (1997) Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
- Vincent KA, Piraino ST and Wadsworth SC (1997) Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products. *J Virol* 71:1897-1905.
- Vogler C, Sands MS, Levy B, Galvin N, Birkenmeier EH, Sly WS (1996) Enzyme replacement with recombinant betaglucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival. *Pediatr Res* 39:1050-1054.
- Vogler C, Sands MS, Galvin N, Levy B, Thorpe C, Barker J, Sly WS (1998) Murine mucopolysaccharidosis type VII: the impact of therapies on the clinical course and pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *J Inherit Metab Dis* 21:575-586.
- Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE, Baty J, Birkenmeier EH, Sly WS (1999) Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to beta-glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy. *Pediatr Res* 45:838-844.
- von Figura K and Hasilik A (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 55:167-193.
- Wada R, Tiffit CJ, Proia RL (2000) Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10954-10959.
- Walkley SU, Thrall MA, Dobrenis K, Huang M, March PA, Siegel DA, Wurzelmann S (1994) Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in



neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2970-2974.

Wenger DA, Coppola S, Liu SL (2002) Lysosomal storage disorders: diagnostic dilemmas and prospects for therapy. *Genet Med* 4:412-419.

Winchester B (2001a) Are there useful biochemical markers of disease activity in lysosomal storage diseases? *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2:52-56; discussion 45-56.

Winchester BG (2001b) Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A:11-19.

Wirhth O, Weis J, Kaye R, Saido TC, Bayer TA (2007) Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiol Aging* 28:1689-1699.

Wolfe JH, Sands MS, Barker JE, Gwynn B, Rowe LB, Vogler CA, Birkenmeier EH (1992) Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* 360:749-753.

Wolfe JH, Schuchman EH, Stramm LE, Concaugh EA, Haskins ME, Aguirre GD, Patterson DF, Desnick RJ, Gilboa E (1990) Restoration of normal lysosomal function in mucopolysaccharidosis type VII cells by retroviral vectormediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2877-2881.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A and Drexler H (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364: 141–148.

Worgall S (2005) A realistic chance for gene therapy in the near future. *Pediatr Nephrol* 20:118-124.

Wraith JE (1995) The mucopolysaccharidoses: A clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 72: 263.

Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, Braakman T, Chadbourne E, Walton-Bowen K, Cox GF (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (Iaronidase). *J Pediatr* 144:581-588.

Xiao X, Li J, McCown TJ, Samulski RJ (1997) Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol* 144:113-124.

Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72:2224-2232.

- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72:2224-2232.
- Young EP (1992) Prenatal diagnosis of Hurler disease by analysis of  $\alpha$ -L-iduronidase in chorionic villi. *J Inherit Metab Dis* 15: 224.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM and Low WC (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11–20.
- Zheng Y, Rozengurt N, Ryazantsev S, Kohn DB, Satake N and Neufeld EF (2003) Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab* 79:233-244.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.