

## Desenvolvimento de nanoemulsões como vetores para o sistema CRISPR/Cas9 visando à edição gênica de fibroblastos MPS I

Fernanda Costa Charles<sup>1</sup>; Helder Ferreira Teixeira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

### INTRODUÇÃO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de depósito lisossômico causada por mutações no gene da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA), o que impossibilita a degradação dos glicosaminoglicanos heparan e dermatan sulfato em diversos tecidos, levando a sintomas multissistêmicos. Como os tratamentos disponíveis apresentam restrições, dentre as abordagens terapêuticas encontra-se a edição gênica, que consiste na correção do defeito genético causador da doença. Desta forma, este projeto visa ao desenvolvimento de nanoemulsões como vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 para fins de edição gênica de fibroblastos de pacientes MPS I, através da correção do gene *IDUA*.

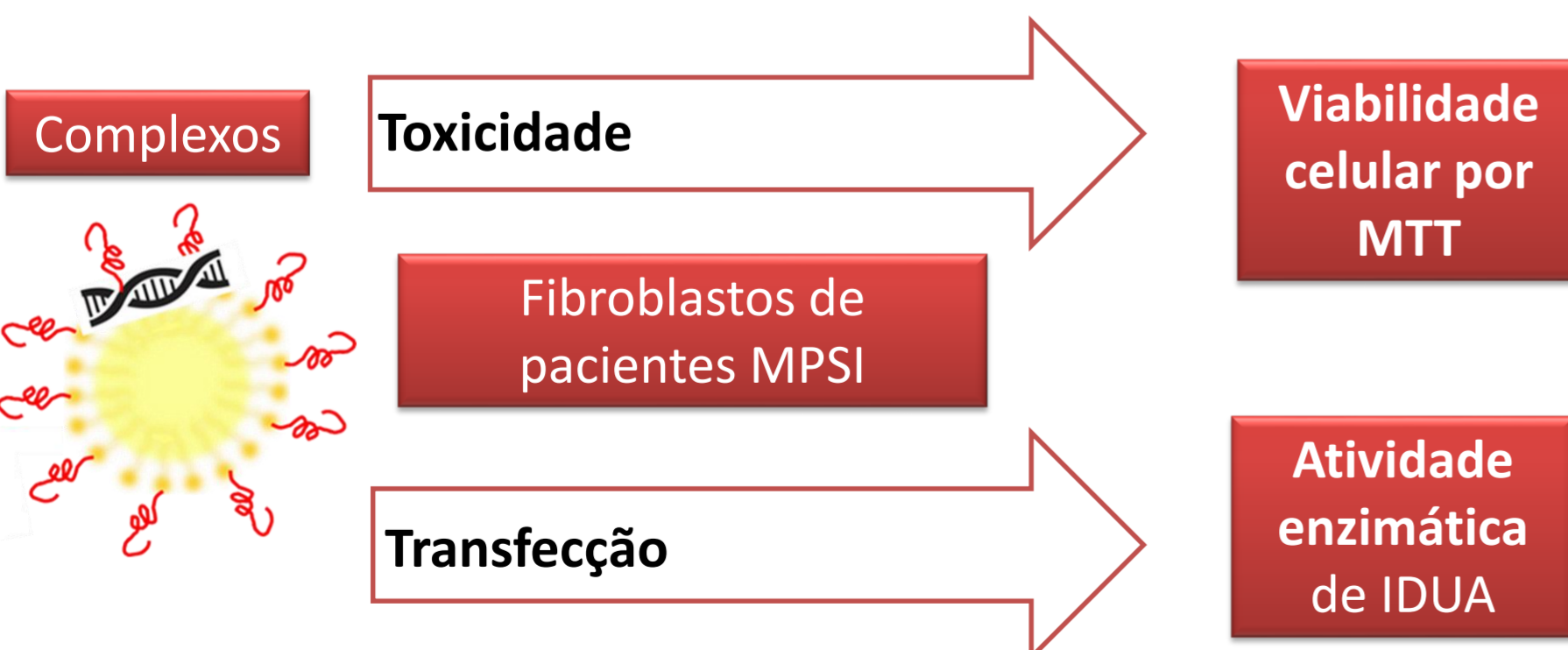
### OBJETIVO

Desenvolver as nanoemulsões e avaliar sua eficiência de transfecção *in vitro* em fibroblastos de pacientes MPS I.

### METODOLOGIA

Nanoemulsões contendo DOPE, DOTAP, DSPE-PEG e TCM foram obtidas por homogeneização à alta pressão. A obtenção de complexos com os ácidos nucleicos foi realizada por adsorção extemporânea do DNA às nanoemulsões na razão de cargas +4/-1.

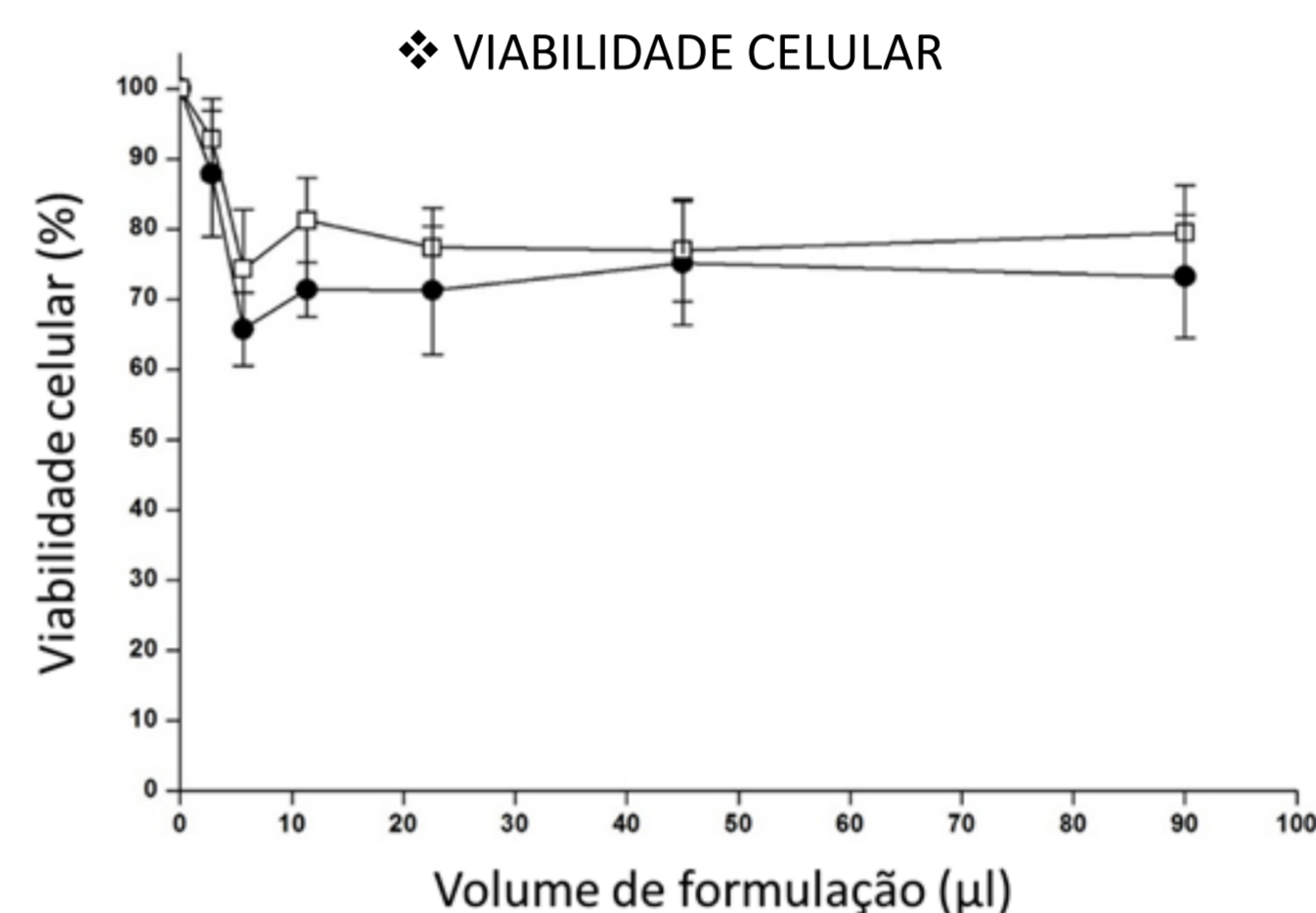
As **formulações e complexos** foram caracterizados em termos de **diâmetro médio**, **índice de polidispersão** e **potencial zeta**.



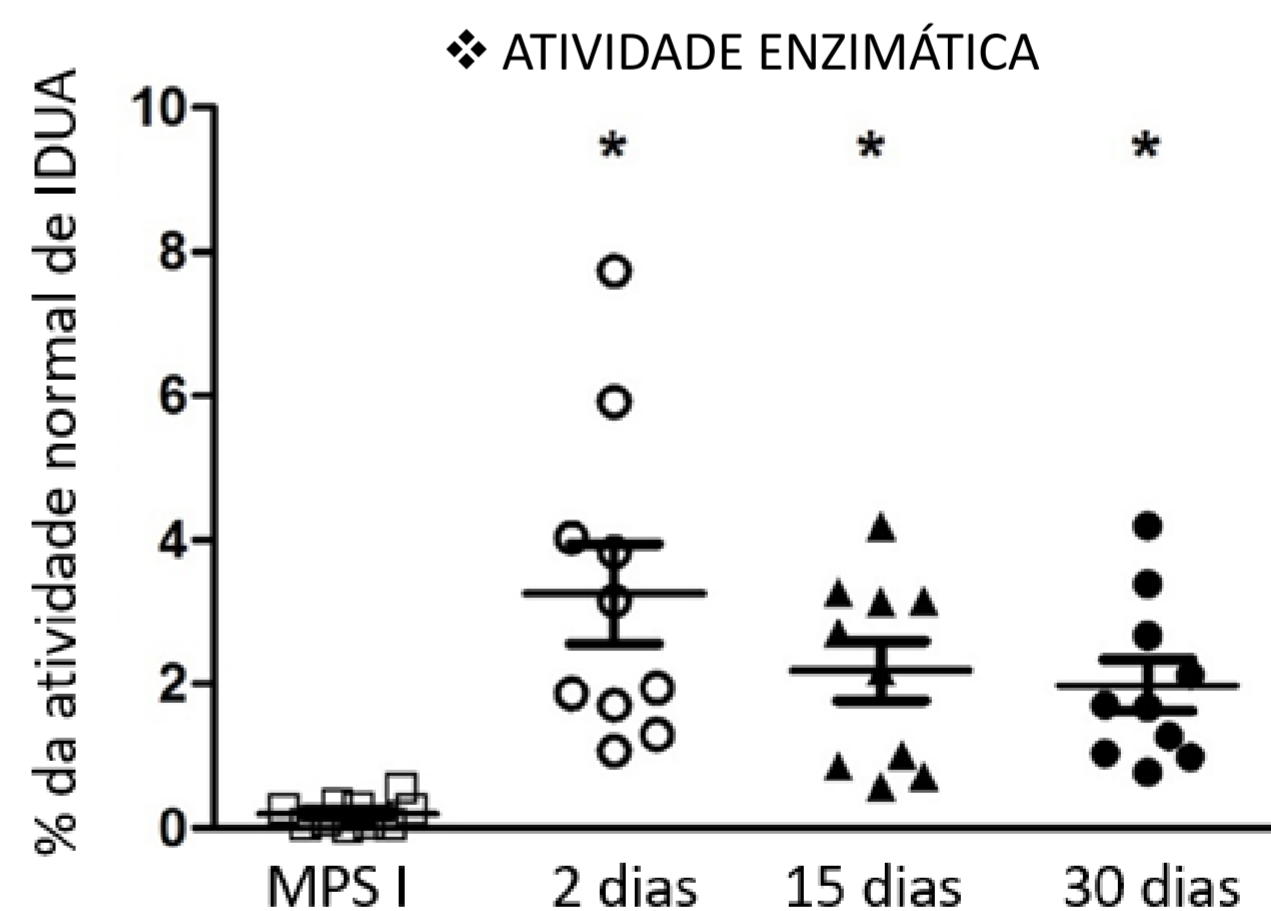
Agradecimentos:

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanoemulsões apresentaram-se monodispersas, com potencial zeta positivo e tamanho de cerca de 150 nm que aumentou quando se adicionou o DNA (~200 nm). Após incubação das células com os complexos, verificou-se um aumento significativo na atividade da enzima IDUA de cerca de 4%, que se manteve após 30 dias de cultura celular.



**Figura 1.** Viabilidade celular de fibroblastos de pacientes MPS I frente à incubação com quantidades crescentes da nanoemulsão branca (N) (●) e dos complexos NA (□). Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.



**Figura 2.** Eficiência de transfecção: porcentagem da atividade de IDUA em células normais após incubação com os complexos NA. Fibroblastos MPS I não tratados e fibroblastos MPS I tratados com NA após 2, 15 e 30 dias de cultura. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos, \*p < 0.05 comparado a fibroblastos MPS I não tratados.

### CONCLUSÃO

A partir do conjunto de resultados, conclui-se que as nanoemulsões são eficientes vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 juntamente com o oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene *IDUA*, e os complexos demonstraram eficiência de transfecção, pois promoveram um aumento significativo da atividade de IDUA em fibroblastos de pacientes MPS I.

### REFERÊNCIAS

Baldo G, Mayer FQ, Burin M, Carrillo-Farga J. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells, *Cells Tissues Organs* 2012; 195(3): 323-329.