

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

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS  
TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

**Fabiana Quos Mayer**

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani**

**Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

**Porto Alegre, julho de 2011**

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

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS  
TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I**

**Fabiana Quoos Mayer**

*Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.*

**Orientador: Prof. Roberto Giugliani**

**Co-orientadora: Profa. Ursula Matte**

**Porto Alegre, julho de 2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Roberto Giugliani que me proporcionou a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela amizade, apoio e incentivo;

À professora Ursula Matte pela amizade, por tornar tudo mais simples, pela oportunidade de crescimento e aprendizado proporcionada, pela disponibilidade, em especial nos últimos dias (que foram poucos!) e pela confiança depositada;

Ao Elmo por toda a paciência e pela ajuda incansável em todas as etapas do curso;

Aos professores do PPGBM, pelos conhecimentos repassados;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo financiamento dos projetos;

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica pelas rodas de chimarrão, pela amizade e por tornar os dias mais agradáveis;

À Márcia, que esteve comigo no desenvolvimento de boa parte deste trabalho;

Ao Gui por tudo que me ensinou;

Aos meus amigos de Rosário, que serão sempre minha segunda família;

À Talita, minha companheira, pela amizade e incentivo;

Ao Jose, que esteve comigo durante toda esta etapa me proporcionado os momentos mais felizes, pela amizade e amor;

E finalmente a toda minha família, em especial meu pai, Flávio, minha mãe, Lígia, minhas irmãs, Bruna e Lícia e meu padrasto Tusto, pois família é o mais importante que se pode ter.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Mucopolissacaridose tipo I.....	11
1.1.1. Aspectos clínicos .....	11
1.1.2. Aspectos bioquímicos e moleculares.....	12
1.1.3. Tratamentos .....	14
1.1.4. Novas abordagens terapêuticas.....	19
1.2. Nanotecnologia aplicada à medicina .....	27
1.2.1. Nanoestruturação de fármacos.....	28
1.2.2. Tipos de nanoestruturas .....	29
1.2.3. Enzimas nanoestruturadas .....	32
2. OBJETIVOS .....	34
2.1. Objetivo geral .....	34
2.2. Objetivos específicos .....	34
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	35
3.1. Artigo I – submetido para a revista Biomedicine and Pharmacotherapy... 35	
3.2. Artigo II – a ser submetido para a revista Nanomedicine .....	51
4. DISCUSSÃO .....	84
5. CONCLUSÕES .....	94
5.1. Conclusão geral .....	94
5.2. Conclusões.....	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Nanopartículas para vetorização de fármacos.....	31
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota de degradação do dermatan sulfato e heparan sulfato.....	13
Figura 2. Transporte de uma enzima lisossômica em uma célula normal e correção do acúmulo na célula de um paciente com MPS.....	15
Figura 3. Representação esquemática das células endoteliais que formam a BHE e suas associações com as células perivasculares.....	16
Figura 4. Ilustração esquemática de plataformas de nanopartículas terapêuticas em estudos pré-clínicos.....	29
Figura 5. Mecanismo de ação de chaperonas farmacológicas.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARSA – Arilsulfatase A

ATP – Adenosina tri-fosfato

BHE – Barreira Hematoencefálica

cDNA – DNA complementar

CFTR – do inglês *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CLN2 – Lipofuccinose Ceróide Neuronal

DGJ – 1-deoxy-galactonojirimicina

DL – Doenças Lisossômicas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

EMA – do inglês *European Medicines Evaluation Agency*

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

GAG – Glicosaminoglicanos

GBA –  $\beta$ -glicosidade ácida

HIV – do inglês *Human Immunodeficiency virus*

HLA – do inglês *Human Leucocitary Antigen*

ICAM-1 – do inglês *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IDUA – alpha-L-iduronidase

*Idua* – alpha-L-iduronidase murina

M6F – Manose-6-fosfato

M6FR – Receptor de manose-6-fosfato

mRNA – RNA mensageiro

MPS I – Mucopolissacaridose tipo I

MPS IH – Mucopolissacaridose tipo I Hurler

MPS IH/S – Mucopolissacaridose tipo I Hurler-Scheie

MPS II – Mucopolissacaridose tipo II

MPS IIIA – Mucopolissacaridose tipo III A

MPS IIIB – Mucopolissacaridose tipo III B

MPS IS – Mucopolissacaridose tipo I Scheie

MPS VI – Mucopolissacaridose tipo VI

NMD – do inglês *Nonsense mediated RNA decay*

NN-DNJ – N-nonyl-deoxynojirimicina

NPC – Nieman Pick C

OMIM – do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*

PMN - Polimorfonucleares

RNA – Ácido ribonucléico

SNC – Sistema Nervoso Central

TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

tRNA – RNA transportador

UGCG – Ceramida glicosiltransferase

uORF – do inglês *upstream open-reading frame*

UTR – do inglês *Untranslated region*



## RESUMO

A Mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene da alpha-L-iduronidase (IDUA), o que leva a uma atividade enzimática baixa ou nula. O principal tratamento é a terapia de reposição enzimática (TRE), que tem limitações como o alto custo, a necessidade de infusões repetidas e a ineficácia do tratamento dos sintomas neurológicos dos pacientes com a forma grave da doença. Novas estratégias terapêuticas são necessárias para superar esses obstáculos. A tradução alternativa tem potencial para aumentar a atividade enzimática, uma vez que há supressão de mutações sem sentido, permitindo que a proteína seja totalmente traduzida. Outra possibilidade é a aplicação de estratégias de nanoestruturação, as quais podem aumentar a eficiência enzimática e a biodistribuição, podendo representar uma redução da dose. Neste trabalho, abordamos ambas as estratégias em dois estudos. No primeiro, fibroblastos de três pacientes com MPS I foram tratados com geneticina, um conhecido indutor de *misreading*, e cloranfenicol, um inibidor da peptidil transferase que também pode atuar da mesma forma. A geneticina não foi capaz de aumentar a atividade ou expressão de IDUA, enquanto o cloranfenicol aumentou 100 vezes apenas nos fibroblastos heterozigotos compostos. O sequenciamento de cDNA sugere que os alelos com mutação sem sentido são alvo do *nonsense mediated mRNA decay*, o que indica que o cloranfenicol atua através de um mecanismo que não a tradução alternativa. Este fármaco é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, podendo ser utilizado como adjuvante à TRE. No segundo estudo, utilizamos uma nanocápsula de núcleo lipídico e paredes múltiplas revestidas com quitosana e íons de  $Fe^{2+}$  que permitem a ligação química com a Laronidase. A enzima nanoestruturada apresentou maior  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  e foi capaz de produzir maior quantidade de produto. Ela não apresentou citotoxicidade na dose utilizada *in vivo* e foi internalizada por transporte ativo não apenas mediado por receptores de manose-6-fosfato. Além disso, o perfil de *clearance* foi melhor, apresentando maior área sob a curva e tempo de meia vida. A análise da biodistribuição mostrou maior atividade da enzima nanoestruturada em diferentes órgãos em 4 h e 24 h. Neste trabalho, ambos os estudos procuraram solucionar diferentes limitações da TRE. É importante ressaltar que estes dois estudos foram baseados em fármacos aprovados para uso, o que viabiliza sua aplicabilidade terapêutica.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by mutations on alpha-L-iduronidase (IDUA) gene, leading to low or null enzyme activity. The treatment of choice is enzyme replacement therapy (ERT), which has limitations such as the high cost, the need of repeated infusions and the inefficacy to treat the patient's neurological symptoms. New treatment strategies are necessary to overcome these hurdles. Stop codon read through (SCRT) is a potential alternative to achieve enhanced enzyme activity as there is suppression of premature stop codon mutations by the addition of a random amino acid in that position, allowing the protein to be fully translated. Other possibility is the application of nanostructuration strategies that may enhance enzyme efficiency and biodistribution, thus leading to reduced dose. In this work, we accessed both strategies in two studies. In the first one fibroblasts from three MPS I patients were treated with geneticin, a known misreading inducer, and chloramphenicol, a peptidyl transferase inhibitor that has been suggested to induce misreading. Geneticin was not able to enhance IDUA activity or expression and chloramphenicol enhanced IDUA activity 100-fold only on compound heterozygous fibroblasts. cDNA sequencing suggested that the nonsense alleles were being target to nonsense mediated mRNA decay and that chloramphenicol acts through a mechanism other than SCRT. As chloramphenicol is able to cross the blood brain barrier, it could be used as an adjuvant to ERT. In the second study we used a multiple wall lipid core nanocapsule coated with chitosan and  $\text{Fe}^{2+}$  ions that allows the chemical linkage of Laronidase. The nanostructured enzyme has an enhanced  $V_{\text{max}}$  and  $K_{\text{cat}}$  and is able to produce higher amounts of product. The modified enzyme is not cytotoxic at the dose used *in vivo* and is uptaken by active transport not only mediated by mannose-6-phosphate receptors. Moreover, the clearance profile is better, showing a higher area under the curve and half-life time. The biodistribution analysis showed enhanced enzyme activity of nanostructured enzyme in different organs in 4 h and 24 h. In this work, both studies access different limitations of ERT with some benefits. Importantly, they are based on drugs approved for use in patient care; therefore, its therapeutic applicability becomes more feasible.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Mucopolissacaridose tipo I

As doenças lisossômicas (DL) abrangem aproximadamente 40 patologias herdadas, bioquimicamente relacionadas e de patofisiologia ainda pouco conhecida. Nas DL há a deficiência total ou parcial de uma enzima específica que causa um acúmulo lisossômico gradual de macromoléculas complexas parcialmente metabolizadas como glicosaminoglicanos, gangliosídeos, glicogênio, glicoesfingolipídeos e glicoproteínas (Hartung *et al.*, 2004). Individualmente as DL são consideradas doenças raras, no entanto, quando analisadas como um grupo, sua prevalência estimada atinge níveis expressivos de 1:7000 nascidos vivos (Meikle *et al.*, 1999). A maioria destas doenças caracteriza-se por seu curso progressivo, com alta morbidade e aumento da mortalidade, embora existam variações significativas entre as diferentes doenças e entre pacientes com a mesma doença (Colombo & Cabello, 2003).

A Mucopolissacaridose I (MPS I) é considerada o protótipo da doença lisossômica progressiva multisistêmica. Ela é herdada de forma autossômica recessiva sendo causada por mutações no gene da alpha-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76) (Kakkis *et al.*, 2001 e Fahnehjelm *et al.*, 2006). A deficiência desta enzima causa o acúmulo de seus substratos, os glicosaminoglicanos (GAG) heparan e dermatan sulfato (Neufeld e Muenzer, 2001). A incidência estimada da MPS I é de 1:100.000 nascidos vivos (Muenzer *et al.*, 2009), sendo que no Brasil a incidência da MPS I é estimada em 1:106.000 (Beiguelman, 1994).

#### 1.1.1. Aspectos clínicos

As manifestações clínicas da MPS I são muito variáveis, em parte devido à diferença na atividade residual da enzima dependendo da mutação gênica causadora da doença (Pastores *et al.*, 2007). Historicamente, a MPS I é classificada em três formas clínicas: MPS IH ou Síndrome de Hurler (a forma grave, OMIM #607014), MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (a forma intermediária, OMIM #607015) e MPS IS ou Síndrome de Scheie (a forma atenuada, OMIM#607016) (Neufeld e Muenzer, 2001).

Pacientes com Síndrome de Hurler possuem atraso progressivo no desenvolvimento corporal e cognitivo (Pastores *et al.*, 2007). Além disso, apresentam opacificação da córnea, obstrução das vias aéreas superiores, problemas cardíacos,

hepatoesplenomegalia e enrijecimento articular, entre outros, ocorrendo óbito usualmente antes da primeira década de vida (Kakkis *et al.*, 2001).

A Síndrome de Hurler-Scheie é caracterizada por um envolvimento somático progressivo, incluindo disostose múltipla, com pouco ou nenhum comprometimento neurológico (Neufeld e Muenzer, 2001). Os sintomas incluem opacificação da córnea, perda da audição, enrijecimento articular e problemas cardíacos. A sobrevivência até a idade adulta é comum, sendo as complicações cardíacas e a obstrução das vias aéreas superiores as principais causas de morte (Neufeld e Muenzer, 2001).

A síndrome de Scheie é caracterizada pela apresentação mais tardia e atenuada dos sintomas, sendo sua progressão mais lenta do que as formas mais graves. Os sintomas são rigidez articular (“mãos em garra”), valvulopatia aórtica, opacidade da córnea e outras complicações, como surdez, hérnia umbilical e inguinal e glaucoma. Pacientes com MPS IS geralmente apresentam estatura e inteligência normais e sobrevivem até a idade adulta (Neufeld e Muenzer, 2001).

#### *1.1.2. Aspectos bioquímicos e moleculares*

A enzima alpha-L-iduronidase é uma glicosidase responsável pela hidrólise de resíduos ácidos alpha-L-idurônicos dos GAG heparan e dermatan sulfato (Neufeld e Muenzer, 2001) (Figura 1). Os GAG são cadeias polissacarídicas ácidas, não ramificadas, compostas por repetições de dissacarídeos que fazem parte da matriz extracelular, onde se apresentam ligados a um núcleo protéico formando os proteoglicanos. Após a remoção proteolítica do núcleo protéico dos proteoglicanos, os GAG são degradados por diversas enzimas lisossômicas em sequência (Winchester, 1996), formando monossacarídeos e sulfatos inorgânicos (Hopwood e Morris, 1990). O heparan sulfato é composto principalmente por ácido glicurônico e glicosaminas, estando presente em proteoglicanos associados à membrana plasmática de diversos tipos celulares, inclusive de neurônios (Schubert, 1989). O dermatan sulfato é composto principalmente por ácido L-idurônico e N-acetilgalactosamina sulfatada e está presente na matriz em tecidos conectivos, como tendões e válvulas cardíacas (Hopwood e Morris, 1990).

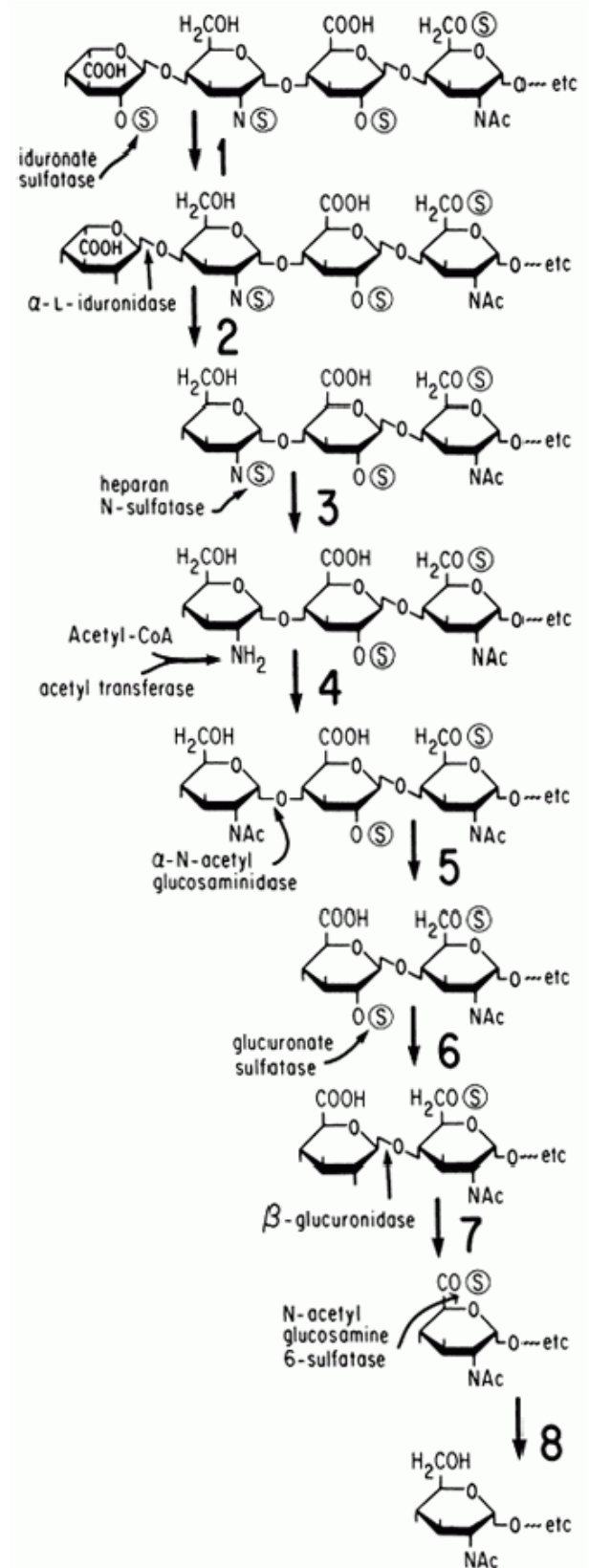
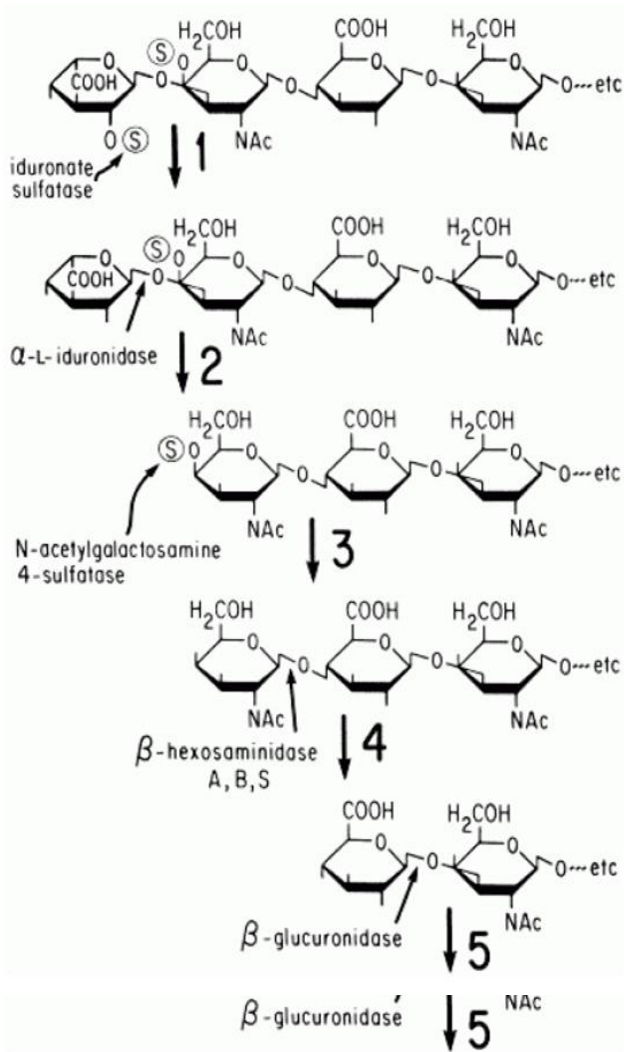


Figura 1: Rota de degradação do dermatan sulfato (esquerda) e heparan sulfato (direita). A deficiência da atividade enzimática da enzima alpha-L-iduronidase, segunda enzima na cascata, causa a Mucopolissacaridose tipo I. Adaptado de Neufeld e Muenzer, 2001.

A detecção da excreção aumentada de GAG na urina é utilizada para a triagem inicial de pacientes com MPS I. Para a obtenção de um diagnóstico definitivo, são realizados testes enzimáticos que utilizam substratos fluorescentes específicos para IDUA (Hall *et al.*, 1978). Os materiais utilizados para estes testes são em geral fibroblastos cultivados, leucócitos ou plasma. Entretanto, tanto a excreção urinária excessiva de GAG como a atividade enzimática deficiente da IDUA ocorrem nas três apresentações clínicas, o que não possibilita prever a gravidade da doença. Por isso, pode ser realizado o diagnóstico molecular, o qual permite identificar, a partir da análise do DNA do paciente, as mutações causadoras da doença. Isso possibilita, em alguns casos, prever a gravidade da doença do paciente dentro do espectro de características clínicas. Assim, as mutações sem sentido, nas quais há a presença de um *stop codon* prematuro estão sempre relacionadas ao fenótipo grave da doença, enquanto os outros tipos de mutações (em sítios de *splice*, de troca de sentido, na qual a mutação causa a troca do aminoácido, deleções e inserções) são heterogêneas quanto à correlação com o fenótipo.

Existem ainda estudos estruturais *in silico* de IDUA que permitem prever o papel das mutações na gravidade da doença, através da análise de parâmetros como a alteração na distância entre os átomos dos aminoácidos da proteína selvagem e mutada e a área de acesso ao solvente. Sugawara e colaboradores caracterizaram desta maneira, 33 mutações de troca de sentido, conseguindo determinar uma boa correlação entre o genótipo e as alterações encontradas na estrutura de IDUA. Desta forma, mudanças estruturais maiores, com maior número de átomos afetados pela troca do aminoácido, foram correlacionadas com pacientes com MPS IH, mudanças intermediárias com MPS IHS e mudanças menores com MPS IS (Sugawara *et al.*, 2008), o que mostra que este modelo pode ser aplicável na predição da gravidade das mutações em IDUA e seu papel no fenótipo apresentado pelos pacientes.

### 1.1.3. Tratamentos

Existem dois tratamentos disponíveis para a MPS I, o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE). Ambos se baseiam no fato de que a enzima alpha-L-iduronidase é modificada com resíduos de manose-6-fosfato (M6F), podendo ser captada pelos receptores de manose-6-fosfato (M6FR) das células dos pacientes (Figura 2).

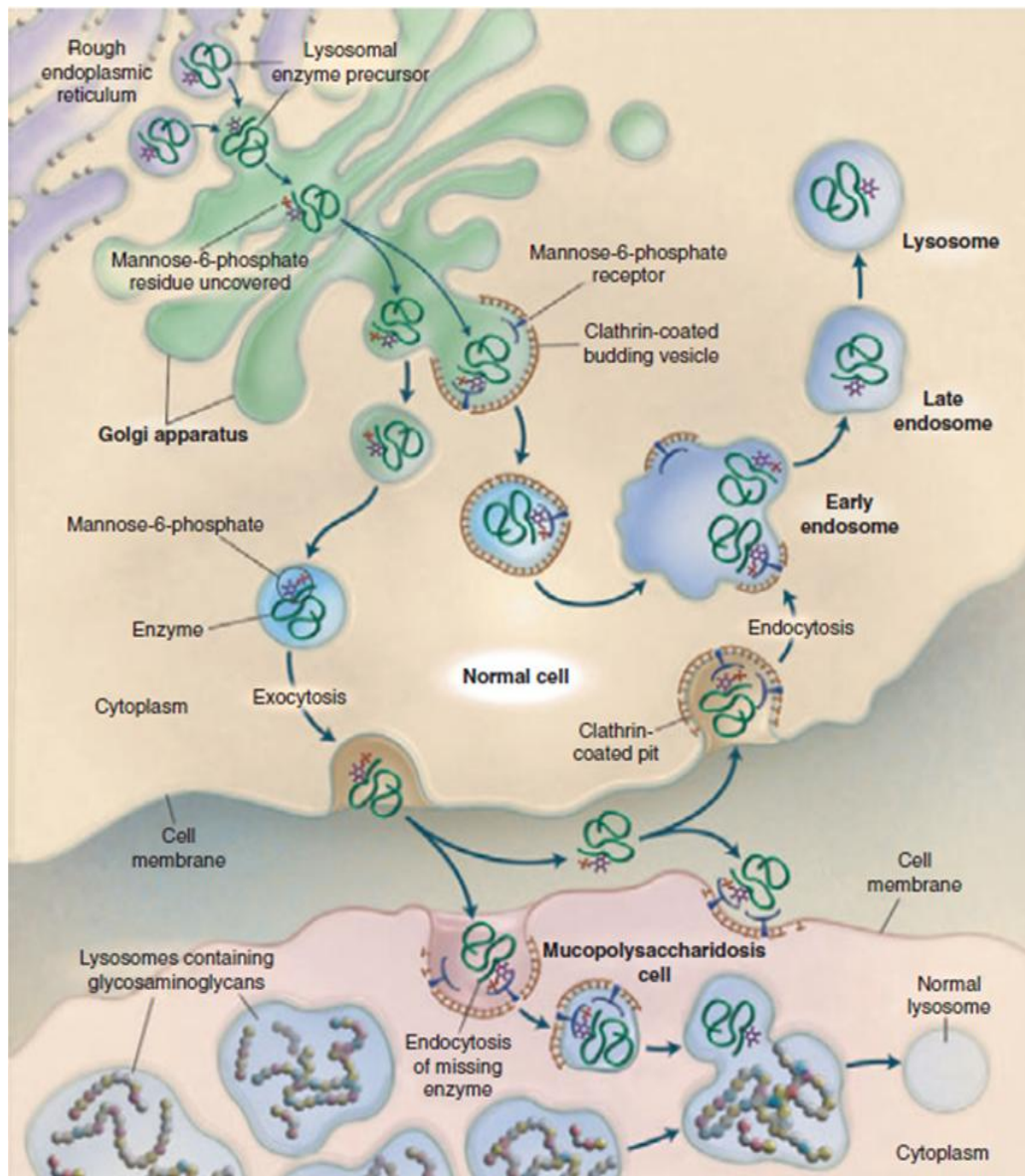


Figura 2: Transporte de uma enzima lisossômica em uma célula normal e correção do acúmulo na célula de um paciente com MPS. O resíduo de manose-6-fosfato é adicionado à enzima lisossômica no complexo de Golgi, onde a enzima modificada se liga aos receptores de manose-6-fosfato. O complexo enzima-receptor é entregue aos endossomos nos quais o pH baixo promove a dissociação do mesmo. A enzima passa ao lisossomo maduro e o receptor de manose-6-fosfato é reciclado ao complexo de Golgi. Uma pequena quantidade de enzima fosforilada escapa da captura pelos receptores de manose-6-fosfato intracelulares e é liberada para o exterior da célula. Esta enzima pode ser recapturada por outro receptor de manose-6-fosfato na superfície celular. Em um paciente tratado com TCTH, a enzima liberada pelas células derivadas do doador pode ser capturada pela célula com MPS, o que corrige o acúmulo de GAG. Adaptado de: Muenzer, J. & Fisher, A, 2004. Copyright [2004] Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.

Tanto o TCTH quanto a TRE não são eficazes para tratar todas as manifestações clínicas da MPS I, principalmente no que se refere aos sintomas neurológicos. Essa limitação ocorre devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira é formada por células endoteliais especializadas que possuem *tight junctions* fortes e por células de suporte, tais como astrócitos e pericitos. Sua principal função é regular a homeostase e proteger o Sistema Nervoso Central (SNC) da entrada de substâncias nocivas (van Rooy *et al.*, 2010). Moléculas capazes de difusão livre através da BHE são compostos lipofílicos menores do que 400 Da. Outros mecanismos de transporte podem ocorrer através de transportadores saturáveis, endocitose adsorptiva e rotas como a transcitose (Figura 3). A BHE, portanto, constitui a principal limitação para o tratamento de doenças que afetam o SNC, como é o caso da MPS I, na qual a enzima deficiente, além de ser hidrofílica, tem um peso molecular de 74 kDa.

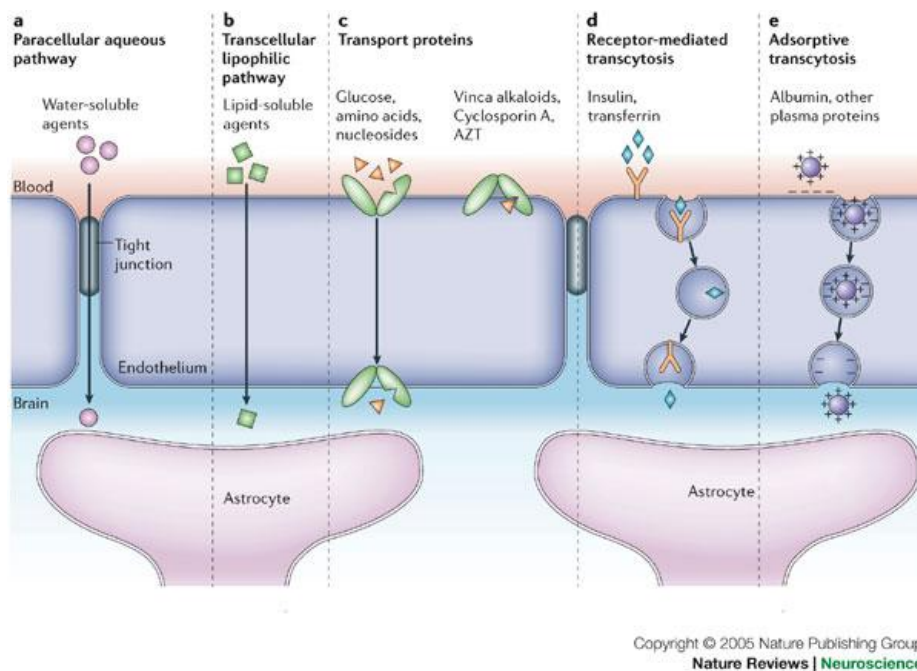


Figura 3: Representação esquemática das células endoteliais que formam a BHE e suas associações com as células perivasculares. As principais rotas de transporte de moléculas através da BHE são mostradas. **A.** As *tight junctions* permitem a entrada de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, incluindo fármacos polares. **B.** As membranas lipídicas do endotélio permitem a passagem de substâncias lipofílicas. **C.** O endotélio contém proteínas de transporte para substâncias como a glicose e aminoácidos. **D.** Algumas proteínas como insulina e transferrina são internalizadas via receptores específicos pelo mecanismo de transcitose. **E.** Proteínas plasmáticas, como a albumina são pouco transportadas, mas sua cationização pode aumentar esse transporte por meio de adsorção. Adaptado de Abbott *et al.*, 2006.



#### 1.1.3.1. Transplante de células tronco hematopoiéticas

O TCTH com o intuito de tratar doenças mendelianas foi primeiramente utilizado em um paciente com MPS I em 1980 (Hobbs *et al.*, 1981). Desde então, mais de 2000 pacientes com diversas doenças genéticas foram tratados com esta abordagem terapêutica (Prasad e Kurtzberg, 2010). O princípio do TCTH é de que a enzima produzida pelas células transplantadas é liberada no plasma podendo ser internalizada por células enzimaticamente deficientes do paciente pelos receptores de M6F. Devido aos riscos associados, como a possibilidade de doença do enxerto contra o hospedeiro, este tratamento é indicado apenas em situações específicas que incluem pacientes com MPS IH e com idade até 24 meses, sendo importante o diagnóstico precoce da doença. Estudos mostram que se feito antes deste prazo, o TCTH é capaz de preservar a habilidade mental dos pacientes, embora em alguns a deterioração da capacidade intelectual ocorra posteriormente (Peters e Steward 2003). Este efeito protetor no SNC ocorre porque uma parcela das células do doador, em particular a linhagem mielomonocítica, migra para o cérebro e se diferencia em microglia (Asheuer *et al.*, 2004).

Os principais resultados positivos do TCTH são observados em curto prazo e se referem às alterações viscerais, com redução da hepatoesplenomegalia e opacidade da córnea (Peters *et al.*, 1996), diminuição das complicações cardíacas, com regressão da hipertrofia ventricular (Braunlin *et al.*, 2003), melhora na audição e melhora nos sintomas de obstrução das vias aéreas (Beck, 2010). Dentre os aspectos negativos do TCTH estão a falta de efeito sobre as deformidades ósseas dos pacientes (Hobbs *et al.*, 1981), a necessidade de administração de altas doses de quimioterapia, o que está associado com riscos de mortalidade precoce e posterior morbidade incluindo efeitos adversos em relação ao crescimento, fertilidade e dentição (Prasad and Kurtzberg, 2010), a dificuldade de encontrar doadores HLA compatíveis e o aparecimento de quimerismo nos pacientes (Bonfim *et al.*, 2007). Porém, como a maioria dos estudos inclui um número pequeno de pacientes que são seguidos em geral por um curto período de tempo (Prasad e Kurtzberg, 2010), é difícil obter conclusões seguras a respeito da segurança e eficácia desta abordagem.

### 1.1.3.2. Terapia de reposição enzimática

A terapia de reposição enzimática consiste na administração direta da enzima de interesse no paciente. Esta abordagem foi inicialmente utilizada em pacientes com Doença de Gaucher (OMIM #230800) e hoje ela já é utilizada em várias doenças lisossômicas de depósito, como Doenças de Fabry (OMIM #301500) de Pompe (OMIM #232300), MPS I, MPS II (OMIM #309900) e MPS VI (OMIM #253200) (Dietz, 2010).

Para o tratamento da MPS I, a enzima utilizada é a Laronidase (Aldurazyme®, Biomarin/Genzyme, EUA). O primeiro estudo com TRE publicado mostrou que após 52 semanas de tratamento houve uma diminuição do acúmulo lisossômico de GAG no fígado de pacientes tratados (Kakkis *et al.*, 2001). Outro estudo com TRE em longo prazo mostrou regressão da hipertrofia ventricular cardíaca esquerda, porém sem diminuição do espessamento das valvas mitrais e aórticas (Braunlin *et al.*, 2006). Ainda, Sifuentes e colaboradores mostraram em outro ensaio clínico que a TRE trouxe benefícios quanto a alguns parâmetros analisados como a redução dos níveis GAG urinários a valores próximos do normal, a permanência da visão e a normalização do tamanho do fígado e do baço, bem como do crescimento e ganho de peso. Porém não houve melhora nos sintomas neurológicos pré-existentes e todos os pacientes acompanhados desenvolveram anticorpos contra a enzima (Sifuentes *et al.*, 2007).

Mais recentemente, um estudo mostrando o efeito da TRE sobre a amplitude de movimento de pacientes com MPS I levou os autores à conclusão de que o tratamento deve iniciar mais cedo e que há a necessidade de acompanhamento de fisioterapia (Tylki-Szymanska *et al.*, 2010). O primeiro estudo que avaliou clinicamente o efeito da TRE aplicada em um paciente com 5 meses de idade ainda assintomático e que foi acompanhado até os 5 anos, mostrou que o único sintoma observado foi uma opacidade de córnea leve, o que trouxe uma clara evidência do benefício da TRE principalmente se iniciada antes do aparecimento dos sintomas (Gabrielli *et al.*, 2010). Este foi apenas o primeiro estudo com paciente pré-sintomático, desta forma, os critérios de inclusão de pacientes com MPS I ao tratamento com TRE ainda são: que tenham o diagnóstico confirmado, que sejam sintomáticos, e que apresentem pelo menos uma manifestação clínica que responda ao tratamento, tais como doença respiratória, infecções de repetição, doenças restritivas, comprometimento cardíaco, comprometimento osteoarticular, apnéia do sono e difícil intubação (Giugliani *et al.*, 2010 A).

A TRE é, portanto a alternativa terapêutica mais segura atualmente, embora ela ainda demonstre pontos negativos. O primeiro deles se refere ao fato de que a enzima não consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica, não havendo a melhora dos sintomas neurológicos (Giugliani *et al.*, 2010 B). Uma alternativa para esta limitação é a administração da enzima por via intratecal, que mostrou em um primeiro ensaio clínico com um paciente, diminuição de GAG no fluido cerebrospinal, melhora na estabilidade e controle da marcha, na ventilação voluntária, na pressão de inspiração máxima e na difusão pulmonar (Muñoz-Rojas *et al.*, 2008), embora a via de administração da enzima nesta abordagem represente uma limitação de segurança importante, o que traz a necessidade de estudos em mais pacientes.

Outros fatores limitantes ao uso da TRE são as reações adversas apresentadas por alguns pacientes. Dentre elas, as mais frequentes são cefaleia, dor abdominal, dispnéia, calafrios, artralgia, hipertensão/hipotensão, reações de hipersensibilidade e exantema. Nos casos em que ocorrem reações graves de hipersensibilidade, a relação risco/benefício da administração da enzima deve ser ponderada e a dosagem de anticorpos anti-IDUA deve ser realizada. Uma alternativa para diminuir os efeitos adversos é a administração pré-infusão de antipiréticos e/ou anti-histamínicos (Giugliani *et al.*, 2010A).

Além dos aspectos de falta de eficiência em corrigir os sintomas neurológicos e da possibilidade de reações adversas devido à administração da enzima, a utilização da TRE é muito dispendiosa para o sistema público de saúde. Em 2008, Souza e colaboradores demonstraram um custo anual para pacientes na Inglaterra de cerca de US\$ 260.000,00 por paciente (Souza *et al.*, 2008).

#### *1.1.4. Novas abordagens terapêuticas*

Tendo em vista as limitações apresentadas pelas terapias convencionais no tratamento da MPS I, a investigação de novas alternativas terapêuticas visando o aumento da eficiência do tratamento, bem como a correção dos sintomas neurológicos se torna necessária. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos neste sentido, cada um utilizando um aspecto diferente da doença para o desenvolvimento de diferentes abordagens, entre elas, a terapia gênica, a microencapsulação celular, a terapia de redução da síntese do substrato, a tradução alternativa e a terapia com chaperonas farmacológicas.

#### 1.1.4.1. Terapia Gênica

A terapia gênica consiste na modificação genética de uma célula ou organismo com o intuito de corrigir uma disfunção celular ou prover novas funções às mesmas (Cotrim e Baum, 2008). As doenças lisossômicas de depósito são excelentes candidatas à terapia gênica, uma vez que elas representam doenças bem caracterizadas de gene único. Além disso, não são reguladas por mecanismos complexos e uma atividade enzimática de apenas 15-20% dos níveis normais tem eficácia clínica (Beck, 2010).

A inserção do gene de interesse se dá através da utilização de vetores, sendo estes classificados em dois grandes grupos, os vetores virais e os não virais. Os vetores virais são extremamente eficientes quanto à transferência gênica, mas oferecem menor segurança devido à possibilidade de ocorrer mutações insercionais, principalmente no caso dos retrovírus, o que é uma importante questão de biossegurança (Cotrim e Baum, 2008). Estes vetores são os mais utilizados, estando presentes em 70% dos ensaios clínicos de terapia gênica (Edelstein *et al.*, 2004) e dentre eles encontram-se os adenovírus, vírus adenoassociado, retrovírus e lentivírus. Os vetores não virais são considerados mais seguros, pois geralmente eles se mantêm episomais, não havendo integração no genoma da célula, porém a eficiência da transferência gênica é menor. Há duas maneiras de introduzir o vetor não viral na célula, uma delas é pela injeção direta do plasmídeo contendo o transgene no tecido, o que abrange cerca de 14% dos ensaios clínicos. A outra maneira é através da utilização de sistemas lipídicos catiônicos, ou lipossomos, os quais interagem com a membrana plasmática, entregando o plasmídeo. Esta abordagem está presente em 9% dos ensaios clínicos de terapia gênica (Cotrim e Baum, 2008).

Existem duas principais formas de terapia gênica, a primeira delas é a terapia gênica *in vivo*, na qual o material genético pode ser introduzido diretamente nas células do paciente. Uma estratégia para a prática deste tipo de abordagem em se tratando das DL, é a utilização de órgãos de depósito, geralmente o fígado ou o pulmão. Através desta estratégia, apenas o órgão é tratado, produzindo grandes quantidades da enzima deficiente que é secretada na circulação sanguínea e pode ser captada pelas outras células do corpo através dos receptores de M6F. O principal problema desta técnica é que a enzima não é capaz de ultrapassar a BHE, sendo necessários ensaios em que os vetores são administrados diretamente no SNC (Pssini *et al.*, 2006). Existe um ensaio clínico com a injeção direta de vetores adenoassociados no SNC de pacientes com

Lipofuccinose Ceróide Neuronal (CLN2, OMIM #204500) e os resultados mostraram que houve melhoras nos sintomas neurológicos por eles apresentados (Worgall *et al.*, 2008).

A outra forma de terapia gênica é a terapia gênica *ex vivo*, na qual as células do paciente são primeiramente modificadas *in vitro* e posteriormente administradas ao paciente (Nardi *et al.*, 2002). Esta abordagem pode ser utilizada em combinação com o TCTH com a vantagem de poder utilizar células autólogas modificadas para superexpressar o gene de interesse, evitando os riscos de doença do enxerto contra o hospedeiro que o transplante oferece. Esta abordagem foi testada em modelos animais deficientes em Arilsulfatase A (ARSA E.C. 3.1.6.8) e mostrou ser eficiente prevenindo os déficits funcionais apresentados por estes animais (Biffi *et al.*, 2006) e também foi testada para o tratamento da MPS I, no qual se observou a reversão completa do fenótipo de camundongos nocaute para *Idua* (Visigalli *et al.*, 2010).

Para o tratamento da MPS I existem outros diversos estudos com diferentes abordagens de terapia gênica. Dentre eles, ensaios *in vitro* mostram que a terapia gênica não viral foi eficiente em reestabelecer a atividade de IDUA em células de pacientes por períodos de até seis meses (Baldo, *comunicação pessoal*). Quando aplicada na forma pré-clínica, a terapia gênica retroviral foi eficiente em prevenir problemas cardíacos, ósseos, auditivos e oculares do modelo animal com MPS I (Liu *et al.*, 2005). Outro estudo utilizando lentivírus mostrou que 1% da atividade normal de IDUA foi capaz de normalizar os níveis de GAG na urina, o fígado e baço, e foi capaz de reduzir o nível de GAG no rim, coração e pulmão após um mês de tratamento. Quando analisados em longo prazo, houve a perda da atividade enzimática e da sequência do vetor, provavelmente devido à resposta imunológica, uma vez que foram detectados anticorpos específicos para a enzima (Di Domenico *et al.*, 2005). Mais recentemente, um estudo testou a utilização de vetores adenoassociados administrados diretamente no SNC de camundongos, mostrando que esta abordagem foi eficiente em prevenir o aparecimento dos sintomas neurológicos quando altos níveis (mais de 40 vezes em relação ao normal) de atividade de IDUA eram atingidos (Wolf *et al.*, 2011).

Embora a terapia gênica seja promissora, muitas questões de segurança e eficácia devem ser abordadas antes que ensaios clínicos em larga escala sejam realizados. Existem os problemas como a mutagênese insercional (que poderão ser evitados a partir dos estudos com os lentivírus autoinativantes de última geração), a resposta

imunológica provocada pelos vetores virais (Ponder, 2007), a baixa eficiência dos vetores não virais (Nardi *et al.*, 2002) e a posterior aprovação de protocolos clínicos pela comunidade científica (Beck, 2010).

#### 1.1.4.2. Microencapsulação celular

A microencapsulação celular é uma técnica na qual há a internalização de células em uma membrana semipermeável, que permite liberação controlada, localizada e de longa duração dos produtos terapêuticos provenientes das células internalizadas (Orive *et al.*, 2002), o que a torna uma estratégia promissora para o tratamento das doenças lisossômicas de depósito (Matte *et al.*, 2011). Esta abordagem permite que as células internalizadas troquem metabólitos e nutrientes com o meio externo, mas não permite o acesso do sistema imunológico a elas, não havendo a necessidade de imunossupressão contínua do hospedeiro (Uludag *et al.*, 2000).

A técnica de microencapsulação celular vem se mostrando promissora como estratégia para o desenvolvimento de órgãos bioartificiais, tratamento de doenças mendelianas clássicas causadas pela deficiência de um produto gênico (Baldo *et al.*, 2011B), tratamento de câncer (Orive *et al.*, 2003) e tratamento de enfermidades como a doença de Parkinson, na qual as cápsulas entregam dopamina e fatores neurotróficos (Zhang *et al.*, 2007). Esta técnica pode ser empregada ainda, em abordagens como a criopreservação e a preservação hipotérmica, nas quais se demonstra haver maior viabilidade das células encapsuladas quando comparadas com células livres submetidas ao mesmo protocolo (Mayer *et al.*, 2010).

A utilização de células microencapsuladas mostrou, em um ensaio clínico de fase I, que a secreção do fator neurotrófico ciliar por células *Baby Hamster Kidney* no ventrículo cerebral de pacientes com Doença de Huntington melhorou os aspectos eletrofisiológicos dos pacientes e demonstrou ser um método seguro, viável e com boa tolerabilidade (Bloch *et al.*, 2004). Para o tratamento das doenças lisossômicas existem alguns estudos *in vitro* e pré-clínicos com a utilização de células recombinantes microencapsuladas modificadas para superexpressar a enzima de interesse (Matte *et al.*, 2011).

Em MPS I, um estudo *in vitro* mostrou que esta abordagem foi capaz de corrigir a deficiência enzimática e diminuir o acúmulo de GAG em fibroblastos de pacientes (Baldo *et al.*, 2011B). Entretanto, um estudo realizado em cães com MPS I mostrou que

a administração das microcápsulas no SNC gerou resposta imunológica e a enzima não foi capaz de se difundir de maneira satisfatória (Barsoum *et al.*, 2003). A resposta imunológica associada à microencapsulação celular está relacionada ao tipo celular internalizado, bem como ao material utilizado nas mesmas (Matte *et al.*, 2011). Esta resposta gera uma capa de fibrose ao redor das microcápsulas em longo prazo (Ratner *et al.*, 2004; Carvalho, 2008), sendo este um possível motivo pela diminuição da liberação da enzima.

Apesar das dificuldades, a técnica de microencapsulação celular pode ser promissora no tratamento da MPS I sozinha ou como adjuvante à TRE. Além da liberação da enzima por um tempo prolongado, pois estima-se que as microcápsulas possuam uma durabilidade média de 6 meses *in vivo*, existe a possibilidade de reversão da doença no sistema nervoso central (SNC) se as mesmas forem aplicadas *in situ*. Porém muitos aspectos, tais como a biossegurança e eficiência de liberação do produto terapêutico, ainda devem ser abordados para que esta técnica seja clinicamente viável.

#### 1.1.4.3. Terapia de redução do substrato

A terapia de redução do substrato é uma nova estratégia que se baseia no princípio de diminuir a quantidade de substrato armazenado em vez de aumentar a atividade das enzimas que o degradam (Beck, 2010). Esta abordagem foi inicialmente proposta para o tratamento da Doença de Gaucher com a substância N-butyldeoxynojirimicina, a qual inibe a enzima ceramida glicosiltransferase (UGCG, E.C.2.4.1.80). Esta enzima é responsável pela síntese do substrato glicosilceramida (Platt *et al.*, 1994) o qual é acumulado na Doença de Gaucher. A N-butyldeoxynojirimicina (Miglustat Zavesca®, Actelion Pharmaceuticals) foi testada quanto à segurança e eficácia em um ensaio clínico, ganhando aprovação para o tratamento de pacientes com Doença de Gaucher leve a moderada que não podem receber TRE (Cox *et al.*, 2000). Este inibidor também foi testado em um ensaio clínico para pacientes com Niemann-Pick tipo C (NPC – OMIM #257220), uma doença na qual há o acúmulo de glicoesfingolipídeos. Como o miglustat inibe a síntese de glicosilceramida, o precursor dos glicoesfingolipídeos, esta abordagem se tornou possível. Os resultados positivos levaram à aprovação na Europa para a utilização do miglustat também para o tratamento de pacientes com NPC. Entretanto, a utilização deste tipo de terapia ainda deve ser cautelosa uma vez que

glicosíngolípídios são importantes em muitos processos biológicos e qualquer inibição ou redução na sua síntese pode ter consequências em muitos sistemas (Fan, 2003).

Para a redução da síntese de GAG existem substâncias tais como a Rodamina B, que foi testada em camundongos com MPS IIIA mostrando um efeito benéfico nas funções neurológicas destes animais (Roberts *et al.*, 2007). Outra substância utilizada é a genisteína, um isoflavonóide extraído de soja que em um ensaio clínico aberto em pacientes com Mucopolissacaridose tipo IIIA (MPS IIIA OMIM#252900) e Mucopolissacaridose tipo IIIB (MPS IIIB OMIM#252920) resultou em melhora significativa de parâmetros como excreção urinária de GAG, morfologia dos cabelos e comportamento (Piotrowska *et al.*, 2008). Ambas as substâncias ainda não foram testadas em MPS I.

#### 1.1.4.4. Tradução alternativa

A tradução alternativa ou *readthrough* traducional consiste na supressão da ocorrência de códons de terminação prematura através da incorporação de um aminoácido aleatório no lugar de mutações sem sentido, permitindo assim a continuidade da tradução até o término normal do transcrito. Há relatos de que alguns antibióticos aminoglicosídeos são capazes de suprimir de forma clinicamente significativa as mutações sem sentido com a subsequente ocorrência da tradução através desse códon prematuro de parada, permitindo a produção em toda a extensão da proteína (Clancy *et al.*, 2001).

O mecanismo de terminação da tradução é altamente conservado entre a maioria dos organismos e é assinalado por três códons: UAG, UAA e UGA. A sequência nucleotídica em torno do códon de terminação também tem um papel importante na determinação da eficiência da terminação da tradução. Antibióticos aminoglicosídicos parecem reduzir a fidelidade da tradução, principalmente através da inibição do mecanismo ribossomal de correção, o chamado *proofreading*, o qual faz com que um amino-acil tRNA mal pareado não seja incorporado a cadeia polipeptídica. Deste modo, os aminoglicosídeos tendem a aumentar a frequência de inserções erradas no códon de parada (*stop codon*), dando a necessária autorização para o ribossomo continuar a tradução até o fim do mRNA (Wilschanski *et al.*, 2003). Contudo, os aminoglicosídeos têm efeitos mínimos sobre a tradução normal, pois o sinal de terminação da tradução normal em eucariotos é cercado tanto à montante como à jusante de sequências que



umentam a eficiência da terminação da tradução, fato que não ocorre quando se trata de mutações sem sentido (Linde *et al.*, 2008).

A gentamicina é o antibiótico mais estudado como indutor do *readthrough* traducional. Estudos mostram que o tratamento com este antibiótico é capaz de suprimir mutações de *stop codon* prematuro no modelo murino de distrofia muscular de Duchenne produzindo a proteína funcional da distrofina *in vivo* (Barton-Davis *et al.*, 1999). Um estudo posterior em humanos, também mostrou evidências positivas a respeito do uso tópico de gentamicina em pacientes com fibrose cística, nos quais houve melhoras no transporte de cloreto da mucosa nasal (Wilschanski *et al.*, 2000). Em MPS I, pelo menos 20 mutações causam a ocorrência de códons prematuros de parada, o que a torna uma candidata à utilização desta abordagem terapêutica. A capacidade da gentamicina em aumentar a atividade enzimática de IDUA foi demonstrada em células geneticamente modificadas para expressar IDUA mutada, bem como em fibroblastos de pacientes (Hein *et al.*, 2004; Keeling *et al.*, 2001). Estes estudos mostram que além do aumento da atividade enzimática, o tratamento com a gentamicina reduz a síntese de GAG e os lisossomos voltam a ter morfologia e distribuição intracelular normais.

Outro fármaco com a propriedade de fazer o *readthrough* traducional é cloranfenicol. Ele foi o primeiro antibiótico de amplo espectro a ser utilizado clinicamente e por seus graves efeitos secundários relacionados à toxicidade sobre a síntese protéica mitocondrial no baço e medula óssea, teve seu uso limitado. A ação clássica do cloranfenicol é de inibir a formação da ligação peptídica (Cundliffe 1981), por se ligar diretamente no sítio catalítico da peptidil-transferase, impedindo o reconhecimento da mesma sobre o seu substrato aceptor (Schlünzen *et al.*, 2001). No entanto, a possibilidade do cloranfenicol ter outros efeitos sobre a síntese protéica foi muito pouco estudada. Um estudo publicado demonstrou a sua capacidade de produzir repressão fenotípica na mesma medida que estreptomicina em modelos bacterianos. Esta observação foi estendida e confirmada por Thompson e colaboradores que demonstraram que esses antibióticos quando interagem com a peptidil-transferase da região da subunidade 50S do ribossomo podem afetar os mecanismos de mudança de fase de leitura ou *frameshifting* e *readthrough* dos códons de parada na subunidade 30S (Thompson *et al.*, 2002).

#### 1.1.4.5. Chaperonas farmacológicas

As enzimas lisossômicas são sintetizadas no ribossomo sendo secretadas no lúmen do retículo endoplasmático ainda em um estado não dobrado. O retículo endoplasmático possui um controle de qualidade rígido que garante que apenas as proteínas corretamente dobradas sejam encaminhadas ao complexo de Golgi para que ocorram as modificações pós-traducionais (Ellgaard *et al.*, 1999). Proteínas que não sejam corretamente dobradas são ubiquitinadas, sendo encaminhadas para a via de degradação pelo proteassoma (Ciechanover, 2005). A conformação na qual a enzima se dobra é dependente da sequência primária de aminoácidos que a compõe (Anfinsen e Scheraga, 1975), sendo que enzimas com mutações que levam à troca de aminoácido muitas vezes retêm uma atividade catalítica parcial dependente da capacidade da mesma de ser encaminhada ao complexo de Golgi e finalmente ao lisossomo.

Chaperonas farmacológicas são moléculas inibidoras que em baixas concentrações tem a propriedade de se ligar ao domínio catalítico da enzima mutada, induzindo a conformação adequada e evitando que a mesma seja endereçada à via de degradação pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático (Fan, 2003). Diversos compostos químicos de baixo peso molecular têm sido empregados como chaperonas farmacológicas, como por exemplo, dimetilsulfóxido, glicerol, trimetilamina N-óxido e ácido 4-fenilbutírico, sendo capazes de reestabelecer a atividade biológica de diversas proteínas maldobradas em diversas doenças humanas (Perlmutter, 2002).

Para o tratamento de Doenças Lisossômicas, a utilização de chaperonas foi inicialmente proposta como terapia para as Doenças de Fabry e Gaucher, sendo posteriormente proposta para Gangliosidose GM2 (OMIM #272800) (Maegawa *et al.*, 2007) e Doença de Pompe, (Okumiya *et al.*, 2007). Para a doença de Fabry, na qual há deficiência da atividade da enzima alpha-galactosidase A (GLA, E.C.3.2.1.22), a atividade enzimática em linfoblastos de pacientes tratados com 1-deoxy-galactonojirimicina (DGJ) aumentou de 7 a 8 vezes, não havendo alteração nos níveis de mRNA de GLA (Fan *et al.*, 1999). Outro aspecto importante é que o tratamento com DGJ em camundongos com Doença de Fabry mostrou ser efetivo e sem efeitos de toxicidade (Ishii *et al.*, 2004). Existem ensaios em humanos utilizando chaperonas farmacológicas em pacientes com Doença de Fabry que mostram uma melhora nos sintomas clínicos dos pacientes (Frustaci *et al.*, 2001).

A utilização de chaperonas farmacológicas para o tratamento da Doença de Gaucher, que é causada pela deficiência da enzima  $\beta$ -glicosidase ácida (GBA, E.C.3.2.1.45), mostrou que em fibroblastos de um paciente homocigoto para p.N370S o tratamento com N-nonyl-deoxynojirimicina (NN-DNJ) aumentou 2 vezes a atividade de GBA (Sawkar *et al.*, 2002). Outros estudos mostram que esta estratégia terapêutica é dependente do fato da mutação desestabilizar o domínio catalítico da enzima ou não, mostrando que a eficiência da resposta ao tratamento pode ser dependente do genótipo do paciente (Sawkar *et al.*, 2005). Em ambas as doenças citadas, o aumento na concentração das chaperonas farmacológicas levou à diminuição da atividade enzimática residual, o que é esperado, visto que essas drogas são inibidores enzimáticos.

Para o tratamento da MPS I, ainda não há estudos com a utilização de chaperonas farmacológicas. Devido ao fato da grande heterogeneidade alélica observada entre os pacientes, a investigação com este tipo de abordagem seria interessante para aqueles com mutações de troca de sentido, bem como para os que sejam heterocigotos compostos. Assim, a terapia com chaperonas farmacológicas poderia atuar como uma possível adjuvante à terapia de reposição enzimática, com a vantagem de que as chaperonas têm um melhor perfil de biodistribuição do que as enzimas recombinantes (Beck, 2010).

## **1.2. Nanotecnologia aplicada à medicina**

A nanotecnologia aplicada à medicina, ou nanomedicina, consiste na utilização de tecnologias de escala de aproximadamente 1 a 500 nm com o objetivo de possibilitar um diagnóstico mais acurado e um tratamento mais efetivo com diminuição dos efeitos adversos (Caruthers *et al.*, 2007). Isso é possível, uma vez que através da manipulação em escala nanométrica de fármacos e outras moléculas e substâncias, as propriedades e atividades dos mesmos podem ser alteradas, permitindo o controle de suas características. A nanomedicina pode ter funções como a criação de novos medicamentos e materiais implantáveis, o melhoramento no diagnóstico de doenças e a liberação controlada de moléculas (Cattaneo *et al.*, 2010).

### 1.2.1. Nanoestruturação de fármacos

A nanoestruturação de fármacos é um dos processos nanotecnológicos no qual há a modificação das propriedades do fármaco através da sua complexação com nanoestruturas. O objetivo da nanoestruturação é melhorar as características do fármaco, como por exemplo, a solubilidade, o tempo de meia vida, a biodistribuição e a farmacocinética (Caruthers *et al.*, 2007). Ainda, a liberação do fármaco pode ser dirigida de modo sítio específico, o que permite que ele seja endereçado a tecidos de difícil acesso, como a BHE (Kreuter, 2001) e que sua dose seja diminuída, evitando a toxicidade e outros efeitos adversos (Torchilin, 2000).

A vetorização dos fármacos, ou seja, o seu endereçamento a uma região-alvo do organismo, independentemente da rota de administração, pode amenizar ou solucionar essa limitação. As principais estratégias para a vetorização de fármacos são: a aplicação direta na região afetada; a vetorização passiva, na qual ocorre o acúmulo espontâneo da substância ativa em regiões de maior permeabilidade; a vetorização “física”, que se baseia na variação do pH e/ou da temperatura na região alvo; a vetorização magnética, na qual o fármaco ou substância está imobilizado em materiais paramagnéticos sob a ação de um campo magnético externo; e a vetorização ativa, na qual a molécula de interesse é modificada com ligantes que tenham alta afinidade pelo sítio-alvo (Torchilin, 2000).

A utilização de carreadores nanoestruturados pode aumentar a eficiência da entrega de fármacos na vetorização passiva (Moghimi *et al.*, 2001). Neste sistema, o tamanho de partículas do carreador, seu grau de hidrofilia e carga de superfície são fatores fundamentais na prevenção da distribuição do fármaco a locais que não sejam seu alvo de ação (Xia e Triffitt, 2006; Yu *et al.*, 2007), permitindo a diminuição da dose do fármaco, e por consequência de seus efeitos adversos. Além disso, estudos demonstram a potencialidade destes carreadores em aumentar a penetração de fármacos no SNC, após administração intravenosa (Kreuter, 2001, Garcia-Garcia, 2005, Alam *et al.*, 2010), embora o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não esteja esclarecido. Entre as alternativas para se aumentar a penetração do fármaco nanoestruturado em tecidos de difícil acesso está o revestimento das nanoestruturas por moléculas hidrofóbicas (Sun *et al.*, 2004; Göppert and Müller, 2005; Gelperina *et al.*, 2010) e a utilização de nanocápsulas poliméricas que mostrou ser capaz de aumentar a penetração da indometacina no SNC, reduzindo o crescimento de glioma em ratos (Bernardi *et al.*,

2009) e aumentando a atividade antioxidante da melatonina no SNC (Schaffazick *et al.*, 2008).

### 1.2.2. Tipos de nanoestruturas

Existem muitos tipos de nanoestruturas com o objetivo de vetorização fármacos e substâncias ativas. Para que uma formulação nanoestruturada tenha sucesso, ela deve ter características importantes, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, proteção da substância ativa a ser carregada, estabilidade coloidal, melhora no perfil de farmacocinética e cinética de liberação controlada (Adair *et al.*, 2010). Dentre as nanoestruturas mais estudadas estão os lipossomas, os polímeros, partículas poliméricas, os dendrímeros e nanopartículas de óxido de ferro (Figura 4).

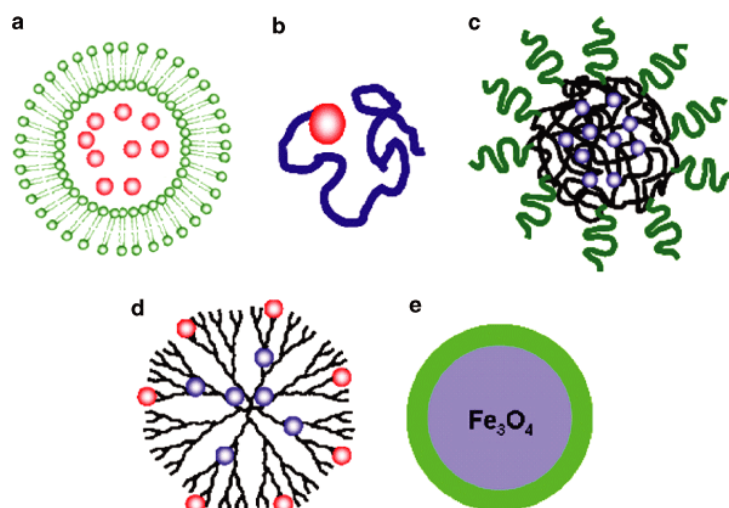


Figura 4: Ilustração esquemática de plataformas de nanopartículas terapêuticas em estudos pré-clínicos: (a) lipossomas (b) Polímeros conjugados a fármacos, (c) nanopartículas poliméricas, (d) dendrímeros, e (e) nanopartículas de óxido de ferro. As esferas vermelhas representam moléculas hidrofílicas e as azuis, moléculas hidrofóbicas. Adaptado de Zhang e colaboradores, Clin Pharmacol Ther. 2008;83:761-9. Todos os direitos reservados.

As nanoestruturas podem ser feitas de diversos materiais, tais como cerâmicas, metais, polímeros, materiais biológicos, entre outros. De acordo com o método de fabricação das nanoestruturas, elas podem adquirir forma, tamanho e propriedades novas (Yih e Al-Fandi, 2006), sendo estas diferentes das observadas em sua matéria-

prima e tornando-as adequada para tipos específicos de doenças. Entre as características físico-químicas estudadas nas nanoestruturas estão tamanho, morfologia, carga de superfície, capacidade térmica, grau de hidrofobicidade, composição entre outros (Cirstoiu-Hapca *et al.*, 2009). A tabela 1 mostra as vantagens e desvantagens de cada tipo de estrutura, bem como as doenças para as quais elas têm sido estudadas como potencial terapia.

Tabela 1: Nanopartículas para vetorização de fármacos. Adaptada de Yih e Al-Fande, 2006 e de Adair e colaboradores, 2010.

Material da nanopartícula	Tamanho (nm)	Agente terapêutico	Potenciais Aplicações Terapêuticas	Vantagens	Limitações
Polímeros biodegradáveis	10 - 100	DNA, proteínas, peptídeos, compostos orgânicos de baixo peso molecular	Terapia de tumores cerebrais, cicatrização óssea vacina adjuvante, tratamento de inflamação, terapia para diabetes	Manutenção do agente terapêutico localizado por semanas	Exocitose das nanopartículas não dissolvidas, necessidade de novas estratégias de síntese para alterar as propriedades (funcionalidade fixada).
Cerâmicas	< 100	DNA, proteínas, agentes quimioterápicos, compostos orgânicos de alto peso molecular	Terapia fotodinâmica, terapia de doenças hepáticas e diabetes	Facilmente preparado, sofre dispersão em água, estável em ambientes biológicos	Toxicidade dos materiais, exocitose das partículas não dissolvidas, síntese demorada e “decoreção” de superfície
Metais	< 50	DNA, agentes quimioterápicos	Terapia de câncer	Pequenas partículas apresentam uma grande superfície de área para entrega	Toxicidade dos materiais, exocitose das partículas não dissolvidas, síntese demorada e “decoreção” de superfície
Partículas Poliméricas	< 100	DNA, agentes quimioterápicos	Terapia de tumores sólidos, tratamento antifúngico, terapia contra o HIV	Adequadas para entrega de fármacos hidrofóbicos, uma vez que possui um núcleo hidrofóbico	Toxicidade dos materiais, necessidade de novas estratégias de síntese para alterar as propriedades (funcionalidade fixada)
Dendrímeros	< 10	Agentes quimioterápicos, agentes antibacterianos e virais, DNA, compostos orgânicos de alto peso molecular	Terapia de tumores, tratamento de infecções bacterianas, terapia contra o HIV	Adequados para entrega de fármacos hidrofóbicos	Toxicidade dos materiais, síntese demorada e necessidade de novas estratégias de síntese para alterar as propriedades (funcionalidade fixada)
Lipossomas	50 - 100	Agentes quimioterápicos, proteínas, DNA	Terapia de tumores e entrega de vacinas	Toxicidade sistêmica reduzida, aumento no tempo de circulação	Necessidade de novas estratégias de síntese para alterar as propriedades (funcionalidade fixada), ausência de estabilidade coloidal

Após a caracterização físico-química das nanoestruturas, estudos das interações das mesmas com sistemas biológicos são necessários para determinar tanto as propriedades de farmacocinética e biodistribuição, como para determinar a indução de toxicidade das mesmas. Grande parte dos estudos testa as nanoestruturas *in vitro*, porém, estudos *in vivo* são mais completos, uma vez que a complexidade é maior, fazendo com que, dependendo das interações das nanoestruturas com diferentes células e proteínas, características como *clearance*, biodistribuição, resposta imunológica e metabolismo sejam diferentes e únicos (Fischer *et al.*, 2007).

### 1.2.3. Enzimas nanoestruturadas

Existem poucos estudos em que enzimas são nanoestruturadas com a finalidade de aumentar sua internalização em diferentes tecidos. Alguns deles envolvem a utilização de lipossomas e outros a utilização da marcação de polímeros com o anticorpo contra a molécula de adesão intracelular (ICAM-1), uma proteína âncora transmembrana presente em diversos tipos celulares.

Em 1997, Ansari e colaboradores utilizaram lipossomas para aumentar a eficiência da entrega de produtos protéicos e estudar o mecanismo patofisiológico de acúmulo de proteínas hidrofóbicas nos lisossomos na DL Lipofuccinose Ceróide Neuronal. Para isso, a subunidade C da ATP sintetase (E.C. 3.6.1.14) e ubiquitina foram internalizadas em lipossomas que quando apresentados a células polimorfonucleares (PMN) ou fibroblastos de pacientes se acumularam nos lisossomos. Estes resultados mostram que as moléculas internalizadas não só foram entregues às células, mas tiveram acesso ao lisossomo, sugerindo, portanto que esta abordagem poderia ser empregada para estudar o metabolismo de proteínas altamente hidrofóbicas pelos lisossomos (Ansari *et al.*, 1997) e que teria potencial terapêutico para as DL.

Mais recentemente, lipossomas carreando enzimas foram utilizados como proposta para ultrapassar a barreira hematoencefálica (Visser *et al.*, 2005). Neste estudo os autores demonstraram que lipossomas marcados com transferrina e carreando uma peroxidase tiveram sucesso em se ligar a células endoteliais da BHE *in vitro* e entregar a enzima internalizada aos lisossomos, provando que esta abordagem pode representar uma vantagem no tratamento das DL.



Em 2008, Garnacho e colaboradores mostraram que a utilização de polímeros carreadores de esfingomielinase ácida (E.C. 3.1.4.12), enzima deficiente na DL Niemann-Pick tipo B (OMIM #607616), feitos de poliestireno e ácido poli (lático-coglicólico) e marcados com anti-ICAM-1 fluorescente tiveram uma rápida, uniforme e eficiente ligação ao endotélio após a injeção intravenosa em camundongos. Neste estudo não houve dano pulmonar detectável, nem permeabilidade vascular alterada. Ainda, houve um rápido *clearance* e aumento do acúmulo das nanoestruturas em relação à enzima livre no rim, coração, fígado, baço e pulmão, mostrando que os nanocarreadores marcados com ICAM-1 apresentam potencial para melhorar a TRE para Niemann-Pick e possivelmente outras DL (Garnacho *et al.*, 2008).

Outro ensaio pré-clínico utilizando a nanoestruturação da enzima para aumentar sua entrega foi realizado em modelo murino de Doença de Fabry. Nos camundongos tratados com os nanocarreadores marcados com anti-ICAM-1 houve maior entrega da enzima alfa-galactosidase no cérebro, rim, coração, fígado, pulmão e baço, bem como nas células do endotélio vascular. Houve ainda, endocitose e transporte das nanoestruturas ao lisossomo, bem como aumento da degradação de globotriosilceramida, o substrato acumulado na Doença de Fabry (Hsu *et al.*, 2011). Esta abordagem, portanto, também teve efeitos positivos no tratamento da Doença de Fabry, podendo ser um tratamento mais efetivo para esta doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho, cujo objetivo geral é buscar novas estratégias terapêuticas para o tratamento da MPS I, é constituído por dois estudos. O objetivo geral do primeiro estudo é avaliar o efeito do tratamento de geneticina e cloranfenicol sobre a expressão gênica e atividade enzimática de IDUA em fibroblastos de pacientes com MPS I. O segundo tem por objetivo avaliar o efeito da nanoestruturação de Laronidase nas propriedades catalíticas da mesma e nos parâmetros de biodistribuição e *clearance* no modelo animal de MPS I.

### 2.2. Objetivos específicos

#### Estudo 1

- 2.2.1. Tratar fibroblastos de pacientes com diferentes genótipos com geneticina ou cloranfenicol e avaliar a atividade enzimática de IDUA antes e após o tratamento.
- 2.2.2. Avaliar a expressão gênica de IDUA antes e após o tratamento.
- 2.2.3. Avaliar o *Nonsense Mediated RNA Decay* nos alelos com códon de parada prematuro.

#### Estudo 2

- 2.2.4. Caracterizar as propriedades catalíticas da enzima Laronidase livre e nanoestruturada.
- 2.2.5. Avaliar a citotoxicidade da enzima Laronidase livre e nanoestruturada.
- 2.2.6. Avaliar o mecanismo de captação da Laronidase livre e nanoestruturada por células de pacientes com MPS I.
- 2.2.7. Tratar camundongos *Idua*<sup>-/-</sup> com a Laronidase nanoestruturada e com a enzima livre e comparar o *clearance* de ambas.
- 2.2.8. Comparar a biodistribuição da Laronidase nanoestruturada com a da enzima livre 4 h e 24 h após a infusão da enzima.

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1. Artigo I – submetido para a revista *Biomedicine and Pharmacotherapy*.**

#### **Chloramphenicol enhances IDUA activity on fibroblasts from Mucopolysaccharidosis I patients**

Fabiana Quoos Mayer<sup>1,2</sup>

Oswaldo Alfonso Artigalás<sup>1,2</sup>

Valeska Lizzi Lagranha<sup>1,2</sup>

Guilherme Baldo<sup>1,3</sup>

Ida Vanessa Schwartz<sup>2</sup>

Ursula Matte<sup>1,2,4</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Post-Graduation Program on Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Corresponding Author:**

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

## Summary

Mucopolysaccharidosis I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by mutations on alpha-L-iduronidase (IDUA) gene, leading to low or null enzyme activity. As nonsense mutations are present in about two thirds of the patients, stop codon read through (SCRT) is a potential alternative to achieve enhanced enzyme activity. This mechanism suppresses premature stop codon mutations by the addition of a random amino acid in that position, allowing the protein to be fully translated. Here, we treated fibroblasts from three MPS I patients with geneticin, a known misreading inducer, and chloramphenicol, a peptidyl transferase inhibitor that was once suggested to induce misreading. Geneticin was not able to enhance IDUA activity or expression and chloramphenicol enhanced 100-fold IDUA activity only on compound heterozygous fibroblasts. cDNA sequencing showed that only the allele without the nonsense mutation was being amplified, leading us to suggest that the nonsense alleles were being target to nonsense mediated mRNA decay and that chloramphenicol acts through a mechanism other than SCRT.

Keywords: chloramphenicol, stop codon read through, Mucopolysaccharidosis I

## Introduction

Mucopolysaccharidosis I is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the alpha-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76) gene. The deficiency of this lysosomal enzyme leads to the storage of glycosaminoglycans (GAG) dermatan and heparan sulfate [1]. Although there is a continuum of clinical phenotypes, MPS I patients are classified into three forms: Hurler syndrome, MPS IH, the most severe form (OMIM #607014); Scheie syndrome, MPS IS, the attenuated form (OMIM#607016); and Hurler/Scheie syndrome or MPS IH/S, the intermediated form (OMIM #607015) [2]. This variability is, in part, associated with the allelic heterogeneity of mutations on IDUA gene [3], in which nonsense mutations in both alleles are associated with MPSI H [4] and account for 76.5% of patients' alleles [5].

Current treatments for MPS I are Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) and Enzyme Replacement Therapy (ERT), both limited in their effects due to different factors. HSCT presents high morbidity and mortality and it is difficult to find a compatible donor [2]. ERT does not correct the neurological symptoms because the enzyme administered

systemically is not able to cross the blood brain barrier [6]. These hurdles have led researchers to develop new treatment approaches for MPS I and other related diseases, such as intrathecal enzyme replacement therapy [7], therapy with microencapsulated cells [8; 9] and gene therapy [10; 11; 12].

Another potential treatment has arisen in the last decade from the studies which described the mechanism of stop codon read through (SCRT) [13]. It has been observed that some molecules can suppress stop codon mutations in a certain extent by adding a random amino acid in that position, thus allowing the protein to be fully translated through mechanisms not completely understood. Aminoglycosides such as gentamicin and geneticin are the main drugs studied for the purpose of SCRT allowing translation of full length proteins with the second being more effective *in vivo* [14]. Different authors have shown that these compounds enhance enzyme activity of different stop codon mutations of several monogenic diseases [15; 16; 17]. For MPS I, there are a few pre clinical trials in which SCRT treatment increased IDUA activity, reduced GAG synthesis and restored the normal lysosomal distribution and morphology within Hurler fibroblasts [17]. Chloramphenicol belongs to another antibiotic class that, despite its mechanism of action is to inhibit the peptidyl transferase enzyme, avoiding peptide bond formation, was used once and showed high efficiency in SCRT by measuring the restoration of the activity in mutated beta-galactosidase [18].

Another issue regarding this approach is that mRNA containing premature stop codons are target of the nonsense mediated mRNA decay (NMD), and there are only a few studies on the effect of stop codon read through upon this route [19; 20]. That made us interested in evaluating the effect of this kind of therapy on mRNA stability or amount on MPS I cells. The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with geneticin or chloramphenicol upon enzyme activity and gene expression in fibroblasts from patients with MPS I bearing different genotypes.

## **Materials and methods**

### *Experimental design and cell culture*

Fibroblasts from two MPS I H patients (p.W402X/p.W402X and p.Q70X/c.1739-1g>t), one MPS IS (p.R89W/p.W402X) and one normal control were maintained in culture

with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, USA) and 2 mM L-glutamine (Gibco, USA). Cells ( $2 \times 10^5$ ) were plated in a 6-well-plate (TPP, Switzerland) and were kept in culture for 24 h with medium supplemented with 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of geneticin (Sigma, USA), 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chloramphenicol (Acros Organics, USA) or without treatment (n=4 wells for enzyme activity and n=3 wells for qPCR analysis). The cells were obtained from patients under informed consent and the project was approved by the local ethics committee.

#### *Enzyme assay*

Enzyme assay was performed in the supernatant and in the fibroblasts of all four subjects either without or after 24 h of treatment with geneticin or chloramphenicol. Alpha-L-iduronidase activity was measured using the fluorimetric substrate 4-Methylumbelliferyl-alpha-L-iduronide (Glycosynth, UK) [21]. Beta galactosidase was measured as a control enzyme using the artificial substrate 4-Methylumbelliferyl-beta-D-galactoside (Glycosynth, UK). Results were calculated as nmol/h/mg protein and expressed as fold increase on enzyme activity compared to non treated cells.

#### *RT-qPCR*

RNA extraction was performed with RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany) and the conversion to cDNA was made using Superscript II conversion kit (Invitrogen, USA). For quantification of *IDUA* mRNA, primers were designed to anneal at exon 2 (5'CACTGGCTGCTGGAGCTT3') and at the junction of exons 3 and 4 (5'GCTCAAACCCTGGGAGGA3'), with an amplicon size of 124 bp. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was the normalizer gene (primer sequences 5'CCCATCACCATCTTCCAGG3' and 5'CATATTTGGCAGCTTTCTCC3'). Quantitative PCR reactions were performed on the MXPro Program (Stratagene – GE Healthcare Life Sciences, USA) using SYBR green master mix (Invitrogen, USA) at 60°C annealing temperature for both genes. The efficiency curve of amplification was 87% for *IDUA* primers and 99% for *GAPDH* primers (data not shown)

### *Sequencing*

To access nonsense mRNA stability, cDNA from patients A (amplicon 3), B (amplicons 1, 4 and 5) and C (amplicons 1 and 3) were sequenced with primers specific to the mutated region (Table 1). cDNA was amplified, purified with Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase and sequenced on ABI 3100 using BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Brazil). The GenBank accession numbers of reference sequences used were NM\_000203.3, M95739.1 and M95740.1.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0) using Friedman test with pairwise comparisons. The comparisons were made between Control, Geneticin and Chloramphenicol groups for all the patients. Statistical differences among groups were considered when  $p < 0.05$ .

## **Results**

Geneticin had no effect upon either intracellular or secreted IDUA activity in any of the fibroblasts studied (Figure 1). Chloramphenicol treatment led to an enhancement of IDUA activity in fibroblasts from patients bearing nonsense mutations in the heterozygous form (Figure 1B and 1C). This increase was also observed in the enzyme secreted to the medium for fibroblasts bearing the p.Q70X/c.1739-1g>t genotype (Figure 1B). In the other fibroblasts enzyme activity was unaltered. As control, beta-Galactosidase was measured and there was a barely increase in the p.W402X/p.W402X patient after geneticin treatment and a slight decrease on the p.Q70X/c.1739-1g>t after chloramphenicol treatment, though without reaching statistical significance (data not shown).

To access the effect of drug treatments upon mRNA expression, *IDUA* mRNA was quantified by real time PCR. No statistical differences were observed on *IDUA* mRNA levels after geneticin or chloramphenicol treatment (Figure 2). For fibroblasts bearing the p.W402X/p.R89W genotype there was an apparent increase in the mRNA levels however the amount of fibroblasts available were enough only for two independent experiments, thus precluding statistical analysis.

As geneticin showed no increase in enzyme activity, we investigated the mRNA stability in all groups. cDNA from fibroblasts with and without treatment were sequenced using primers designed to amplify the mutated region of each subject. Nonsense alleles failed to amplify systematically both before and after treatment. Fibroblasts homozygous for p.W402X had not enough amplicons to be sequenced. In the case of fibroblasts p.Q70X/c.1739-1g>t, the nonsense allele failed to amplify and the sequencing of the initial portion of the cDNA was normal. Fibroblasts from subject p.R89W/p.W402X seemed homozygous for p.R89W. The amplicon bearing the region with p.W402X appeared normal upon sequencing (Table 2).

## **Discussion**

A few studies have shown a positive effect of treatment with aminoglycosides for SCRT on MPS I cells. These works showed a fold increase on patient's fibroblasts enzyme activity around 10 times [22; 17]. Here, we observed a similar fold change after geneticin treatment, but it was not statistically significant (Figure 1). This can be explained by the high variability of data within the groups. Another explanation is that the nonsense alleles probably are being target to NMD, which is suggested here because we observed amplification failure of nonsense alleles. It is worth noticing that the results showed in figure 2 regarding mRNA amplification in patient A was probably due to the increased sensitivity of real time PCR, whereas the amount of mRNA obtained was not enough for sequencing. Moreover, as we did not observe significant differences in the amount of *IDUA* mRNA after geneticin or chloramphenicol treatment, we believe that NMD could be occurring prior of misreading. Previous studies on MPS I have shown NMD in patients homozygous for p.W402X and p.Q70X [23]. Linde et al. [20] showed that in cases of efficient NMD, the level of nonsense transcripts is markedly reduced, being insufficient to generate enough functional proteins even when gentamicin is provided. Thus, as we observed in our study, SCRT treatment has no effect in patients with markedly low levels of nonsense transcripts [20]. It is worth noticing that the position of the premature termination codon is only one among the factors that determine NMD efficiency, as patients with the same genotypes and different NMD levels have been described [20].



There was no effect of geneticin or chloramphenicol on enzyme or mRNA levels in normal cells, showing a specific effect of the therapy to mutated cells. This result is similar to that found by Keeling et al. [17] and different of those described by Hein et al [22], who showed a decrease on enzyme activity in normal controls after treatment with gentamicin.

Moreover, this is the first study to show the effect of chloramphenicol upon IDUA activity in MPS I fibroblasts. This drug showed better results when compared to geneticin in enhancing IDUA activity. To the best of our knowledge, there is only one study showing that chloramphenicol promotes highly significant frameshifting, leading the authors to conclude that it either perturbs the relative orientations of the aminoacyl and peptidyl-tRNAs at the peptidyl transferase centre or the configuration/catalytic activity of the site itself [18]. Here, we observed no effect of chloramphenicol in fibroblasts homozygous to a nonsense mutation (p.W402X) and an important increase of more than 100-fold on IDUA activity in fibroblasts from patients B and C, 50% and 25% of normal IDUA levels described in the literature [24].

The mechanism of action of chloramphenicol in such cases shall be other than the SCRT since nonsense alleles failed to amplify even after chloramphenicol treatment. One possibility is that it would be acting as a pharmacological chaperone, stabilizing IDUA and thus enhancing its activity. Pharmacological chaperones are molecules with the ability to bind to the catalytic domain of mutated enzymes leading them to acquire a proper conformation, thus avoiding degradation by the endoplasmic reticulum's quality control system [25]. Several chemical compounds have been used as pharmacological chaperones being able to restore the biological activity of misfolded proteins in many human diseases [26]. As chaperone's activity is dependent on whether the mutations destabilize the catalytic domain of the enzyme, the efficiency of the treatment may be dependent on the patient genotype [27], similar to the observed here.

## **Conclusion**

We suggest that the positive response to SCRT therapy is dependent not only on the patient's genotype but also on efficiency of the targeting of nonsense alleles to NMD. Our data also suggests that chloramphenicol could be acting as a pharmacological chaperone stabilizing mutated IDUA. Considering that an enzyme activity of only 15-20% of the

normal level can be sufficient for clinical efficacy [28] and the large allelic heterogeneity observed in MPS I patients, we consider that this approach is a potential therapy that can be used ancillary to ERT, with the advantage that chloramphenicol is able to cross the blood brain barrier, which may have a beneficial effect for patients with neurological involvement.

## References

[1] Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York: McGraw-Hill, 2001. p. 3421-3452.

[2] Vazna A, Beesley C, Berna L, Stolnaja L, Myskova H, Bouckova M, Vlaskova H, Poupetova H, Zeman J, Magner M, Hlavata A, Winchester B, Hrebicek M, Dvorakova L. Mucopolysaccharidosis type I in 21 Czech and Slovak patients: mutation analysis suggests a functional importance of C-terminus of the IDUA protein. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:965-74.

[3] Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JT, Guffon N, Kaplan P, Muenzer J, Norato DY, Shapiro E, Thomas J, Viskochil D, Wraith JE. Epub 2007 Mar 2. The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab*. 2007;91:37-47.

[4] Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med*. 2003;5:286-94.

[5] Brooks DA, Muller VJ, Hopwood JJ. Stop-codon read-through for patients affected by a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med*. 2006;12:367-73.

[6] Giugliani R, Federhen A, Carvalho C, Artigalás O. Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type I: Laronidase. *Pediatric Health*, 2010;4:133–45.

[7] Muñoz-Rojas MV, Vieira T, Costa R, Canani S, John A, Jardim LB, Vedolin LM, Raymundo M, Dickson PI, Giugliani R. Intrathecal Enzyme Replacement Therapy in a Patient with Mucopolysaccharidosis type I and Symptomatic Spinal Cord Compression. *Am J Med Genet* 2008;146A:2538-44.

[8] Baldo G, Mayer FQ, Burin M, Carrillo-farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human MPS I cells. *Cells Tissues Organs*, in press.

[9] Matte U, Carvalho TG, Mayer FQ, Lagranha VL, Giugliani R. Cell Microencapsulation: a Potential Tool for the Treatment of Neuronopathic Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, in press.

[10] Traas AM, Wang P, Ma X, Tittiger M, Schaller L, O'Donnell P, Sleeper MM, Vite C, Herati R, Aguirre GD, Haskins M, Ponder KP. Correction of clinical manifestations of canine mucopolysaccharidosis I with neonatal retroviral vector gene therapy. *Mol Ther* 2007;15:1423-31.

[11] Chung S, Ma X, Liu Y, Lee D, Tittiger M, Ponder KP. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alpha-L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 2007;90(2):181-92.

[12] Metcalf JA, Ma X, Linders B, Wu S, Schambach A, Ohlemiller KK, Kovacs A, Bigg M, He L, Tollefsen DM, Ponder KP. A self-inactivating gamma-retroviral vector reduces manifestations of mucopolysaccharidosis I in mice. *Mol Ther*. 2010;18:334-42.

[13] Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin

suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1683-92.

[14] Yang C, Feng J, Song W, Wang J, Tsai B, Zhang Y, Scaringe WA, Hill KA, Margaritis P, High KA, Sommer SS. A mouse model for nonsense mutation bypass therapy shows a dramatic multiday response to geneticin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:15394-9.

[15] Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol.* 2003;15-21.

[16] Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, Reinert P, Lenoir G, Lesure JF, Rousset JP, Edelman A. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med.* 2007;5:5.

[17] Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet.* 2001;10:291-9.

[18] Thompson J, O'Connor M, Mills JA, Dahlberg AE. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol.* 2002;322:273-9.

[19] Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Floquet C, Shiozuka M, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset JP, Matsuda R, Ikeda D, Guicheney P. Drug-induced read through of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes. *J Gene Med.* 2008;10:217-24.

[20] Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, Kerem B. Nonsense-mediated mRNA decay affects

nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest.* 2007;117:683-92.

[21] Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta* 1979;92:257-65.

[22] Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA. Alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol.* 2004;338:453-62.

[23] Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA, Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1407:249-56.

[24] Fan JQ. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:355-60.

[25] Perlmutter, D.H. Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr. Res.*2002;52:832–836

[26] Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, Kelly JW. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol.* 2005;12:1235-44.

[27] Beck M. Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *IUBMB Life.* 2010;62: 33–40.

## Tables

Table 1: Primers used for cDNA amplification and sequencing.

<i>Amplicon</i>	<i>Exons</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>
1	1 – 4	5'CGCCCAGACTCCGACCCG3'	5'CGCCAGTCCGTACCTACCG3'
2	3 – 7	5'GCTTGTCACCACCAGGGGG3'	5'GCGACGACCTTCTCCTGCTCC3'
3	6 – 9	5'GCGTGCGGCTGGACTACATC3'	5'CGGGTGTCGTCGCTCGC3'
4	9 – 12	5'CCTGGACAGCAACCACAC3'	5'CATCCGACCAGACCAGAAC3'
5	11 – 14	5'CCGTCGCTTTTGCTGGTG3'	5'GCAAAGGGGGTGATGGGAGG3'

Table 2: Comparison of DNA and cDNA genotyping by automated sequencing before and after geneticin or chloramphenicol treatment.

Patient	<i>DNA</i>		<i>cDNA before treatment</i>		<i>cDNA after geneticin or chloramphenicol treatment</i>	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
A	p.W402X	p.W402X	Amplification failure	Amplification failure	Amplification failure	Amplification failure
B	p.Q70X	IVS11-1g>t	Normal	Amplification failure	Normal	Amplification failure
C	p.W402X	p.R89Q	Normal	p.R89W	Normal	p.R89W

## Figure legends

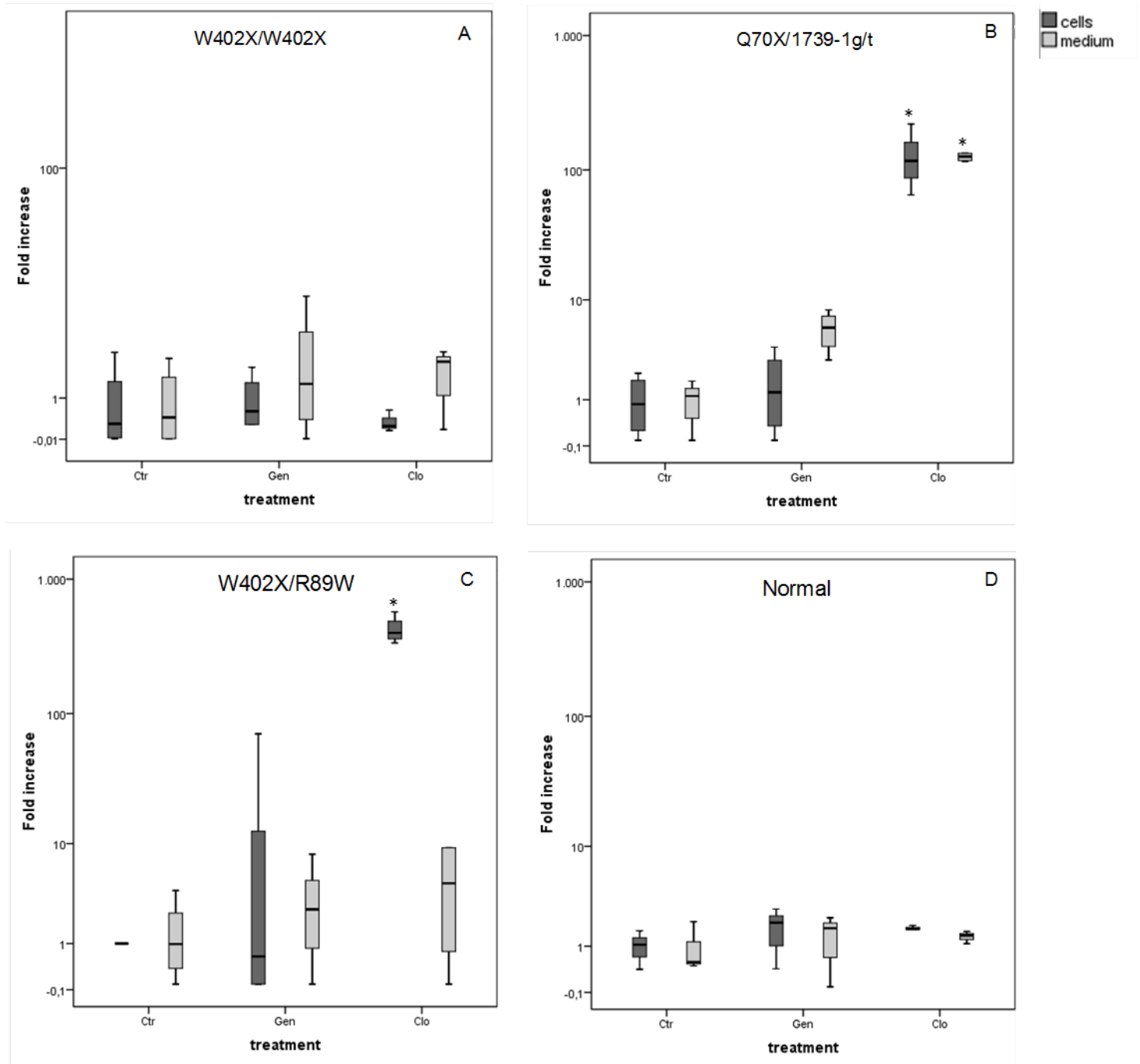
Figure 1: Fold increase on IDUA activity after geneticin or chloramphenicol treatment in fibroblasts with different genotypes. Data is presented as median with range. \* $p < 0.05$  when compared to the control (untreated cells).

Figure 2: *IDUA* mRNA levels after geneticin or chloramphenicol treatment in fibroblasts with different genotypes. Data is presented as median with range.

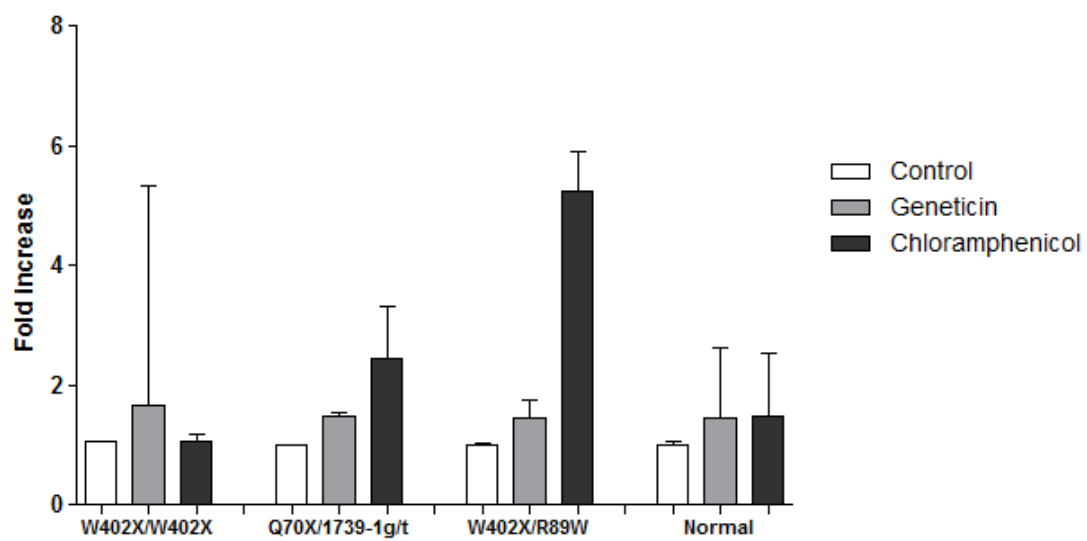


# Figures

## Figure 1



**Figure 2**



### **3.2. Artigo II – a ser submetido para a revista Nanomedicine**

#### **Multiple wall lipid core nanocapsules coated with Laronidase: potential application for a more effective treatment of Mucopolysaccharidosis Type I**

Fabiana Quoos Mayer<sup>1,2</sup>

Márcia Duarte Adorne<sup>3</sup>

Talita Giacomet de Carvalho<sup>1,2</sup>

Anna Cláudia Dilda<sup>1</sup>

Eduardo Bender<sup>3,4</sup>

Adriana Raffin Pohlmann<sup>3,4</sup>

Ursula Matte<sup>1,2</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Micro and Nanoparticles Applied to Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Post-Graduation Program on Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Corresponding Author:**

Ursula Matte

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

## **Summary**

Mucopolysaccharidosis type I is a genetic disorder caused by alpha-L-iduronidase deficiency. The main treatment is enzyme replacement therapy (ERT), which has limitations such as the high cost and the need of repeated infusions. Nanostructuring strategies may enhance enzyme delivery to organs and can represent a dose reduction, enhancing ERT efficiency. Here we propose a multiple wall lipid core nanocapsule coated with chitosan and  $\text{Fe}^{2+}$  ions that allows the chemical linkage of enzyme. We describe the nanocapsules production, optimization and its physicochemical characterization. The nanostructured enzyme has an enhanced  $V_{\text{max}}$  and  $K_{\text{cat}}$  and is able to produce higher amounts of product. The modified enzyme is not cytotoxic and is uptaken by active transport mediated not only by mannose-6-phosphate receptors. Moreover, the clearance profile is better, showing a higher area under the curve and shelf-life time. The biodistribution analysis showed enhanced enzyme activity in different organs in 4 h and 24 h.

**Keywords:** Mucopolysaccharidosis type I; Enzyme Replacement Therapy; Nanocapsules

## **Introduction**

Advances in genetic engineering and biotechnology have allowed the achievement of a greater range of peptides and proteins to prevent or reverse disease processes (Hu et al., 2004; Martins et al., 2007). The proteins are organic products with relatively high specificity, which would allow the administration of low doses to produce therapeutic effects. However, the application of these biomolecules is impaired due to low bioavailability and high clearance rate through enzymatic degradation (Tan et al., 2010). Thus, strategies regarding enzyme nanostructuring are promising to increase its therapeutic efficacy.

Targeting of drugs with nanoparticles is a process in which the properties of the drug are changed through its conjugation with the particle. The goal of targeting is to improve drug characteristics, such as absorption (Carino et al., 2000), solubility, half-life (Kim et al. 2008), biodistribution and pharmacokinetics (Caruthers et al., 2007;). In addition, the drug release can be directed to difficult access tissues, such as the brain (Kreuter, 2001). Moreover, as the properties are changed, the dose can be reduced, thus avoiding a major problem associated with drugs systemic administration, the non-

selective biodistribution in the body, which determines the need for high doses to achieve therapeutic concentrations at the site of action, leading to increased drug toxicity (Torchilin, 2000).

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I, OMIM #607014) is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by alpha-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76) deficiency. This enzyme cleaves alpha-L-iduronic and L-iduronic acid residues from the glycosaminoglycans (GAG) dermatan and heparan sulfate (Neufeld e Muenzer, 2001), thus its deficiency leads to systemic accumulation of these substances. The treatment of choice for MPS I is the enzyme replacement therapy (ERT), in which recombinant enzyme is administered to the patient every two weeks. This therapy has some limitations: the neurological symptoms are not corrected because the enzyme is not able to cross the blood brain barrier (BBB) (Giugliani et al., 2010A), the high cost of the therapy (about US\$260,000.00/patient/year) (Souza et al., 2008), and the immunological response to the infused enzyme, which makes necessary the administration of antipyretics and/or antihistamines before enzyme infusion (Giugliani et al., 2010B).

The efficacy of ERT for MPS I may benefit from nanotechnology-based modifications, enhancing enzyme delivery to organs and possibly allowing a dose reduction which may represent either a decrease in adverse events observed in patients as well as a decrease in the cost of the therapy. Targeting IDUA in a nanoparticle may help to improve ERT therapy, as the pharmacokinetics and biodistribution profiles can be altered to obtain a more effective device. Here we address a new strategy based on nanostructuring of the commercial available enzyme for the treatment of MPS I (Laronidase). The system is a multiple wall nanocapsule in which the enzyme is linked on the surface through interactions with  $Fe^{2+}$  ions (Figure 1).

## **Materials and Methods**

### *Ethical issues*

This study was approved by Ethics in Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) under GPPG 09-334 and GPPG 11-0302. MPS I patient's fibroblasts were obtained from the Medical Genetics Service of HCPA. *Idua* knockout mice (*Idua*<sup>-/-</sup>; C57BL/6 background) were kindly provided by Dr. Elizabeth Neufeld

(UCLA, USA) and were maintained at the Experimental Animal Unit from HCPA with 12 h dark/light cycles with food and water *ad libitum*.

#### *Lipid core nanocapsules production*

Lipid core nanocapsules (LNC) suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method (Fessi et al., 1989). The organic phase containing Poli( $\epsilon$ -caprolactone) (MW = 14.000) (PCL) (Aldrich, France), Span 60 (Sorbitan Monostearate) (Aldrich, France) and Triglycerides of capric/caprylic acids (Delaware, Brazil) were dissolved at 40°C. Lipoid® S75 (75% in phosphatidylcholine, Gerbras, Brazil) was dissolved in ethanol and added to the organic phase. The aqueous phase was prepared by dispersing the polysorbate 80 (Delaware, Brazil) in water. The organic phase was poured continuously into the aqueous solution. After 10 minutes, the organic solvent was removed and the suspension was concentrated under reduced pressure to adjust the final volume to 10 mL. For LNC coating with chitosan, a chitosan solution (low molecular weight chitosan (CS); deacetylation degree of 75.6%, and viscosity of 20,000 CPS, Aldrich France) 0.3% (w/v) was prepared in acetic acid 1% and filtered. The LNC suspensions were coated using three different amounts of chitosan solution (LNC-CS<sub>0.03</sub> LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub>, with a final chitosan concentration of 0.03%, 0.05% and 0.075% respectively).

After LNC-CS production, iron ions (Fe<sup>2+</sup>) were adsorbed to their surface for later recovering with Laronidase. A Fe<sup>2+</sup> solution of 0.018 M was prepared using FeCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (Aldrich, USA) and was added to LNC-CS suspensions under high magnetic stirring until a concentration of 4.5 mM. After 1 minute of Fe<sup>2+</sup> addition, 11 µg/mL or 96 µg/mL of Laronidase (Aldurazyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, USA) were added to LNC-CS-Fe<sup>2+</sup> for enzyme conjugation.

#### *Lipid core nanocapsules characterization*

The formulations were characterized before and after coating with chitosan and enzyme, 30 minutes after preparation. All the experiments were performed using three batches of each formulation.

The size distribution was measured at Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). The mean diameter values were expressed through the average size of the volume distribution (D[4.3]), while the size distribution was expressed using the value

corresponding to the SPAN, calculated through the values of  $D_{(0,1)}$ ,  $D_{(0,5)}$  and  $D_{(0,9)}$ , which correspond respectively to diameters of 10%, 50% and 90% of cumulative volumes.

The mean diameter and polydispersity index (PDI) were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and the zeta potential was measured by electrophoretic mobility. Both procedures were performed using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments UK) at 20°C. The pH of LNC formulations was determined by the potentiometric method (B474; Micronal, Brazil).

The stability of LNC nanoformulations was performed using the multiple scattering of light technique on TurbiscanLab® equipment (Formulacion, France) (Mengual et al., 1999a). The buckets were filled with 10 mL sample without dilution and analyzed at 25°C over 1 hour.

#### *Enzyme kinetic properties*

The kinetic properties of enzymes were determined using 4-methylumbelliferil- $\alpha$ -L-iduronide fluorescent substrate in a microplate kinetic assay at 37°C for 40 minutes with fluorescence measures ( $\lambda_{ex} = 365$  nm,  $\lambda_{em} = 450$  nm) obtained in 20 seconds intervals. The substrate concentrations ranged of 0.23 mg/mL to 0.014 mg/mL and the assay was performed in Spectramax M3 (Molecular Devices, USA). The final enzyme concentration used in the assay was 1.89  $\mu$ g/mL. All tests were performed in 3 replicates.

#### *In vitro cytotoxicity analysis*

Nanostructured Laronidase (LNC<sub>1E1</sub>) cytotoxicity was evaluated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (USB Corporation, USA) assay according to Mosmann (1983). MPS I patient's fibroblasts were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LGC, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) and 1% penicillin/streptomycin (standard culture conditions). When confluent, cells were trypsinized and 5000 cells were plated in a 96-well plate (TPP, Switzerland) for 24 h before the assay (n=3). Concentrations ranging from 1.16  $\mu$ g/mL to 0.0058  $\mu$ g/mL of Laronidase, nanostructured Laronidase (LNC<sub>1E1</sub>) or nanostructure (LNC-CS<sub>0.05</sub>) were incubated for 24 h with the fibroblasts. After this period, the medium was removed and MTT solution (0.5mg/mL) was added. After 4 h

incubation, 100  $\mu$ L of DMSO was added to dissolve the blue formazan crystals and the optic density was measured at 570 nm in a microplate reader (Anthos, Germany). Fibroblasts without treatment were considered as 100% cellular viability, while 0% cellular viability was obtained after incubation with Triton X-100 (10%, w/v). All tests were performed in 3 biological replicates.

#### *In vitro cell uptake analysis*

MPS I patient's fibroblasts were plated ( $2 \times 10^5$  cells,  $n=5$ ) and maintained under standard culture conditions for 24 h. Then, 0.0038  $\mu$ g/mL of Laronidase or nanostructured Laronidase (LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>) was added to the medium and the enzyme activity inside the cells was measured by fluorescence assay as described above (Hopwood et al., 1979) after 4 hours incubation. To analyze enzyme uptake mechanisms, cells were also incubated in the presence of 5mM mannose-6-phosphate (Sigma-Aldrich, USA), 3 $\mu$ g/mL Filipin (Sigma-Aldrich, USA), or 4°C for 1 hour (Contreras-Ruiz et al., 2011).

#### *Clearance and biodistribution*

Four-old-month *Idua*<sup>-/-</sup> mice received Laronidase (0.085  $\mu$ g/g) or nanostructured Laronidase (LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>; 0.085  $\mu$ g/g) via tail vein in 200  $\mu$ L. To determine the clearance of the enzyme from blood circulation, 30  $\mu$ L blood samples were collected under isofluorane anesthesia at 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes after infusion. The area under the curve (AUC) and the half-life time of the enzyme circulation were measured using Sigmaplot version 11.0.

The animals were sacrificed after 4 h ( $n=3$ /group) or 24 h ( $n=3$ /group) of injection to determine the biodistribution. Animals were anesthetized with isofluorane and perfused with 20 mL of phosphate saline buffer. After this procedure, the liver, kidney, spleen, lungs, heart, and brain were collected and maintained at -80°C until enzyme activity analysis, which was performed by incubation of macerated tissue with the substrate 4-methylumbelliferil-alfa-L-iduronide. The proteins were measured by the method of Lowry (Lowry et al., 1951).



### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by the Predictive Analytics SoftWare (PASW, version 18.0). Used tests were specified on tables/figure legends. Statistical differences among groups were considered when  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *Lipid core nanocapsules characterization*

The nanocapsules showed cloudy white appearance, which was sustained after chitosan addition. The solution pH ranged from  $3.4 \pm 0.16$  for LNC-CS<sub>0.075</sub> to  $3.7 \pm 0.05$  LNC-CS<sub>0.03</sub>, which was significantly lower than the pH  $6.4 \pm 0.04$ , observed on LNC ( $p < 0.05$ ).

The formulations were analyzed by laser diffraction before and after chitosan coating to ensure that all particles were in nanometer range and to get the values of average size and polydispersity (SPAN). The size distribution was measured by volume and number (Figure 2). The LNC suspension presented only nanometer particles with a diameter of approximately 130 nm with monomodal distribution and high homogeneity of size distribution, evidenced by SPAN value close to 1 (Table 1). After chitosan coating, the suspensions of LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub> remained in the nanometer range, with a mean diameter of 140 nm and 132 nm, respectively, both with low polydispersity. The formulation LNC-CS<sub>0.03</sub> presented a small population of particles in the micrometer scale when analysed by volume with high polydispersity (Figure 2).

The zeta potential of formulations was accessed by determining the electrophoretic mobility in Zetasizer to demonstrate the coating of chitosan by the LNC. The potential values for LNC were negative. After the addition of chitosan, the suspension LNC-CS<sub>0.03</sub>, maintained a negative potential, indicating that there wasn't full coverage of the particles. On the other hand, the formulations LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub> showed positive values of zeta potential, indicating that there was efficient coating of LNC (Table 1). To characterize the nanoscopic population of formulations, the average diameter and polydispersity index (PDI) were determined. The diameters ranged between 67 nm and 76 nm with a polydispersity index lower than 0.17 (Table 1). The formulation LNC-CS<sub>0.075</sub> had a higher average diameter when compared to LNC

( $p < 0.05$ ). PDI values were lower than 0.2 for all suspensions, indicating a narrow particle size distribution. Profiles of size as a function of intensity, volume and number, showed a monomodal distribution for all formulations (Figure 3).

#### *Characterization of lipid core nanocapsules coated with $Fe^{2+}$ and Laronidase*

For the development of multiple wall lipid core nanocapsules, formulations that were completely coated with chitosan were chosen. Thus, four different formulations were obtained with different Laronidase concentrations (Table 2). All formulations of multiple wall nanocapsules showed opalescent appearance. After enzyme nanostructuration, the pH was maintained close to that of the commercial enzyme, with values ranging from  $4.1 \pm 0.08$  for LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> to  $4.2 \pm 0.07$  for LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Figure 4 shows the profiles of size distribution as function of volume and number. The formulations LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> kept the population of particles in nanometer range, whereas LNC<sub>1</sub>E<sub>2</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>1</sub> had a small population of micrometric particles when analyzed by volume. Therefore, only LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> were considered suitable for further analysis. Photon correlation spectroscopy of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> formulations was performed. The mean diameter of LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> was higher than the diameter of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ ). Both formulations showed narrow nanometer distribution (PDI < 0.2) (Table 3).

Size distribution measures of Laronidase (in aqueous phase) were performed as function of intensity, volume and number. The comparison between the profiles of free and nanostructured Laronidase allowed verifying that the enzyme was able to chemically bind to the nanostructures (Figure 5A). The size distribution of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> depending on intensity, volume and number showed a monomodal profile (Figure 5B).

To access the stability of formulations, multiple scattering of light was used. Since the signal transmission was zero throughout the analysis, the relative backscattering profiles ( $\Delta BS$ ) were used. Both formulations showed an increased  $\Delta BS$  signal at the base of bucket followed by a reduced sign at the top. No significant changes on  $BS$  signal were observed at the center of the cuvette (Suppl. figure 1).

### *Enzyme kinetic properties*

Both formulations developed were tested regarding enzyme activity profile. The formulation LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> showed reduced enzyme activity when compared either to LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> or to Laronidase (data not shown). Thus, the kinetic properties were determined only for the LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> formulation and for Laronidase. Table 4 shows the results of Km, Vmax, Kcat and the amount of produced product. There was no significant difference between the Km of Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, but the Vmax, Kcat and the amount of produced product of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> were significantly higher than Laronidase, proving that the nanostructuring of Laronidase improves the enzyme properties.

### *In vitro cytotoxicity analysis*

Nanostructured Laronidase cytotoxicity was evaluated with MTT assay using MPS I patient's fibroblasts that were cultivated with concentrations ranging from 1.16 µg/mL to 0.0058 µg/mL of Laronidase, LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> or LNC-CS<sub>0.05</sub> (Suppl. figure 2). Laronidase caused no cytotoxicity in any of the concentrations tested. Both, LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC-CS<sub>0.05</sub> caused about 30% cell death in higher concentrations, but reached 90-100% cell viability in concentrations lower than 0.232 µg/mL and 0.0232 µg/mL respectively.

### *In vitro cell uptake analysis*

The ability of Laronidase or LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> to be uptaken by cells was analyzed *in vitro* by adding the enzymes to the medium of MPS I patient's fibroblasts. Both forms of Laronidase were able to be internalized restoring normal enzyme activity levels inside MPS I patient's fibroblasts (Suppl. figure 3).

To verify the cell uptake mechanisms by which LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> was being internalized, MPS I patient's fibroblasts were submitted to different protocols. Alpha-L-iduronidase is uptake by mannose-6-phosphate receptors, which was confirmed by the reduced intracellular activity of Laronidase after incubation with mannose-6-phosphate (Figure 6). However, no decrease in enzyme activity was observed for LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>. As the incubation with mannose-6-phosphate did not suppress the LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> uptake, active transport inhibition was performed to verify the possibility of membrane diffusion. Cell incubation at 4°C resulted in a reduction of enzyme uptake by the two groups, showing that LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> is uptake by active transport (Figure 6). To access the possibility that

LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> was being internalized by a caveolin-mediated endocytosis, incubation with Filipin, a specific caveolin-mediated endocytosis inhibitor, was performed. No difference was observed between the uptake of both Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> after Filipin treatment.

#### *Clearance and biodistribution*

To assess the clearance from the circulation and the biodistribution in tissues of Laronidase or LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, 0.085 µg/g of body weight was injected i.v. into 4-month-old *Idua*<sup>-/-</sup> mice (n=3/group/time). The serum enzyme activity from the animals that received LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> was higher than those who received Laronidase, with an area under the curve over three-fold higher (p<0.01) and a higher shelf-life time (Figure 7). The enzyme administered intravenously was detectable in the circulation after 4 hours of perfusion, while in 24 h the enzyme activity was almost nil for both groups (data not shown).

Enzyme activity was measured in five peripheral organs and in the CNS. After 4 hours of infusion, the animals who received LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> presented higher enzyme activity in the liver, spleen and heart (p<0.05) (Figure 8A). Interestingly, after 24 h, the enzyme activity was higher not only in the liver but also in the kidney (Figure 8B). In spleen, heart and lungs there was no significant difference between animals that received Laronidase or LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> at 24 h. In the CNS there was no difference on enzyme activity either 4 h or 24 h after infusion.

#### **Discussion**

In this study, we proposed the development of multi-wall lipid core nanocapsules in order to obtain a suitable carrier for binding the enzyme Laronidase and improve the enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis I. In the first stage of nanoparticle development, LNC were coated with three different concentrations of chitosan. The suspension LNC-CS<sub>0.03</sub>, that presented size distribution profile with the presence of micrometric particles, showed a negative zeta potential and close to zero, considering an electrostatic stabilization mechanism. Thus, the low concentration of chitosan promoted the formation of micrometric clusters by the attraction between the particles.

The total inversion of zeta potential indicated a proper coating with polymer suspensions was observed only for LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub>. In addition, the particle size analysis showed that LNC-CS<sub>0.075</sub> had a higher diameter when compared to LNC<sub>0.05</sub>, indicating a thicker layer of chitosan in this formulation. These results were observed either by Siqueira et al. (2011), who showed that coating polymeric nanocapsules with a cationic layer of chitosan caused both inversion of zeta potential and enhancement of mean diameter, which was attributed to the presence of amino groups in chitosan.

The suspensions LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub>, which provided the best profiles of cationic coating, were used in trials to adsorb Fe<sup>2+</sup> ion on the surface combined with two concentrations of Laronidase. Analysis by laser diffraction, photon correlation spectroscopy and multiple scattering of light confirmed the formation of stable nanosized particles and the conjugation of Laronidase on the nanocapsule surface in the concentrations tested. The maintenance of size in nanometer range is important to be compatible with the administration route. Moreover, the monomodal peaks observed after enzyme conjugation (Figure 5) showed that the high affinity between the Fe<sup>2+</sup> ions and Laronidase allowed its complete conjugation with the nanocarrier, thus promoting the formation of a hybrid structure. This conjugation is the result of electrostatic interactions between the NH<sub>2</sub> and SH functional groups present in amino acid residues along the polypeptide chain and the metal adsorbed on the nanocapsule surface (Rana et al., 2010; Samanta et al., 2008).

After enzyme nanostructuration, the pH remained close to the commercial enzyme. The maintenance of pH is an important aspect in the development of carriers for biomolecules binding, especially enzymes, because of the necessity of environmental conditions able to keep the structure and their optimal activity (Nelson et al., 2006). Since Laronidase is a lysosomal enzyme, the acid pH, observed after nanostructuration, is important to maintain its optimal activity (Hopwood et al., 1979).

Stability results showed that both LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> were stable. Only 3% of the formulations presented an increased signal at the base of  $\Delta BS$  cuvette and a reduced one at the top. Destabilization phenomena occurs when there is a particle sedimentation from top to bottom of the cuvette leading to a positive  $BS$  signal on the base and a negative  $BS$  signal on the top (Celia et al., 2009). In addition, no changes on  $BS$  signal were observed at the center of the cuvette. Variations in the middle portion of the

cuvette are related to irreversible destabilization involving particle size changes, such as coalescence and aggregation (Mengual et al., 1999b). Therefore, the two suspensions were stable, showing a little reversible destabilization phenomenon that is attributed to density difference between the dispersed and continuous phases.

The enzyme activity of both LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> was analyzed and compared to Laronidase. The formulation LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> showed a reduced activity when compared to LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> or Laronidase, that can be attributed to the steric hindrance generated by the higher number of enzyme units around the nanoparticles in the formulation LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, hampering the arrival of the substrate to the active site of the enzyme, thus, only the catalytic properties of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and Laronidase were studied. There was no significant difference between the Km of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and Laronidase, while the Kcat (Vmax/enzyme concentration) and catalytic efficiency (Ecat - Kcat/Km) was higher for LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>. These superior properties were able to ensure that a greater amount of product was obtained from the same substrate concentration, showing that Laronidase nanostructuration is a device to obtain an enzyme catalytically more efficient.

Nano-sized particles have been used as enzyme supporting materials to improve enzymes' capability due to their unique size and physical properties (Ipe and Niemeyer, 2006). However, a decrease on enzyme activity is expected if essential amino acid residues located close to active site are involved on conjugation process (de Graaf et al., 2009). Hong et al., (2004) showed that enzyme activity is influenced by the nature of nanocarrier surface. They observed that chymotrypsin can be inhibited after nanostructuration either by denaturation or by retention of its structure. Here we used interactions with metal to obtain a nanostructured enzyme. This is an appropriate approach as the non-covalent conjugation promotes a better specificity because the transition metals are able to form complexes with the side chains of amino acid residues containing imidazole group (Kim et al., 2007). In previous work, Abad et al. (2005) developed gold nanoparticles coated with Co<sup>2+</sup> ion that were efficiently complexed to two enzymes presenting histidine residues on its N-terminal. The binding of the enzymes was prevented by elimination of these residues. We observed an improvement on Laronidase's catalytic properties that can be attributed to its linkage to the nanoparticle. Despite the presence of histidine residues within the active site of IDUA (Rempel et al., 2005), the interaction with Fe<sup>2+</sup> ions probably occurred on inert regions of the enzyme.

After enzyme properties characterization, *in vitro* studies were carried out to describe the cytotoxicity and cell uptake mechanism. Cytotoxicity analysis was performed on MPS I patient's fibroblasts with different concentrations of Laronidase, LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> or LNC-CH<sub>0.075</sub>. Laronidase did not cause cell death in any of tested concentrations. Both LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC-CH<sub>0.075</sub> caused about 30% cell death in higher concentrations, but achieved 90-100% cell viability in concentrations lower than 0.232 µg/mL and 0.0232 µg/mL respectively. Cationic polymer nanoparticles can be toxic in high concentrations (Goldberg et al., 2007). As the enzyme recovers the polymeric nanostructure, reaching of 100% viability is expected to occur in higher concentrations for LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> than the uncovered nanocapsule. Moreover, the usual dose of Laronidase to the patient is 1.2 µg/g body weight (Giugliani et al., 2009) every two weeks. We tested 1.16 µg/mL medium in 5000 cells and observed 30% cell death, thus the implementation of dose for *in vivo* studies will probably cause no toxicity.

Since there was no significant cytotoxicity of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, *in vitro* experiments were performed to compare the uptake of Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>. There was no difference in enzyme activity on MPS I patient's fibroblasts after treatment with both enzymes (Suppl. figure 3). This indicates that LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> is active in a biological system and is able to be internalized by patient's cells. However, unlike Laronidase, the nanostructured enzyme is internalized by a pathway other than the mannose-6-phosphate receptor. Although we were not able to completely characterize such pathway we ruled out the passive diffusion or caveolin-mediated endocytosis.

Finally *in vivo* pharmacokinetics studies were performed to evaluate if the improved catalytic properties of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> influenced on clearance and biodistribution profiles. *Idua*<sup>-/-</sup> mice received 0.085 µg/g body weight of Laronidase or of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>. This concentration, although lower than the therapeutic dose (1.2 µg/g body weight), corresponds to the maximum volume of 200 µL for an animal of approximately 25 g, as the optimal enzyme concentration in the nanostructured formulations was 11 µg/mL. The enzyme activity in animals that received the of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> was higher at all times analyzed, showing that Laronidase nanostructuration was able to change its pharmacokinetic profile, increasing the circulation time of the active enzyme. In addition, LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> was also responsible for a higher enzyme activity in peripheral organs (Figure 8). However, the modified enzyme was not able to cross the blood brain barrier, probably because its mechanism of internalization is mediated by active transport based

on receptors that are not expressed on vascular endothelial of the Central Nervous System.

Enzyme nanostructuration is a relatively new approach, but with increasing number of studies. In 2008, Garnacho et al. showed that the use of polymer carriers of acid sphingomyelinase (EC 3.1.4.12) targeted with anti-ICAM-1 had a quick, uniform and efficient binding to the endothelium after intravenous injection in mice. They observed a rapid clearance and increased accumulation of nanostructures compared to free enzyme in kidney, heart, liver, spleen and lungs, showing a possible improvement on ERT for Niemann-Pick type B (OMIM # 607616) (Garnacho et al., 2008). Another pre-clinical study using enzyme nanostructuration was performed with alpha-galactosidase (E.C.3.2.1.22) in a murine model of Fabry disease. Mice treated with a nanocarrier also targeted with anti-ICAM-1 had a greater alpha-galactosidase activity in the brain, kidney, heart, liver, lungs and spleen, as well as in vascular endothelial cells. Endocytosis and lysosomal transport of the nanostructures were also shown, as well as increased degradation of globotriaosylceramide, the substrate accumulated in Fabry disease (Hsu et al., 2011). Both studies used nanocarriers targeted to bind to a specific molecule. In the present work we developed a nanocarrier system based on interactions of Laronidase with metal to obtain a nanostructured lysosomal enzyme which showed improved catalytic properties as well as better clearance and biodistribution profiles.

Even though the presented formulation is not able to overcome one of the great limitations of ERT, that is, reaching the CNS, it can be beneficial to address two other negative aspects of ERT. One limitation is the need of high concentrations of enzyme that may be involved in the immunological response observed in many patients and that requires the administration of antipyretics and/or antihistamines before enzyme infusion (Giugliani et al., 2010B). As nanostructuration enables the achievement of higher activity from smaller amounts of drugs, it is likely to reduce adverse effects by diminishing the doses (Torchilin, 2000). The new system proposed in this work proved to be more effective than conventional therapy, so a possible dose reduction can represent a weaker immune response. In this same sense, it can help dealing with the high costs of this therapy. Souza et al. (2008) estimated a cost of US\$ 260.000,00/patient/year in England. The more effective formulation proposed here can represent a reduction of costs, which would make ERT available more quickly to the



patients. It is worth noticing that the dose used in this study was lower than that usually administered to the patients, so more investigations regarding dose adjustment and therapeutic efficacy are needed.

## References

- Abad JM, Mertens SF, Pita M, Fernández VM, Schiffrin DJ. Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc.* 2005;127:5689-94.
- Carino G, Jacob JS, Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release.* 2000;65:261-269.
- Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18:26-30.
- Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009 Aug 1;72(1):155-60.
- Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, Párraga JE, López-García A, Fernández I, Seijo B, Sánchez A, Calonge M, Diebold Y. Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomer-based nanoparticles in cultured human ocular surface cells. *Mol Vis.* 2011;17:279-90.
- de Graaf AJ, Kooijman M, Hennink WE, Mastrobattista E. Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation. *Bioconjug Chem.* 2009;20:1281-95.
- Garnacho C, Dhami R, Simone E, Dziubla T, Leferovich J, Schuchman EH, Muzykantov V, Muro S. Delivery of acid sphingomyelinase in normal and niemann-pick disease mice using intercellular adhesion molecule-1-targeted polymer nanocarriers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:400-8.
- Giugliani R, Federhen A, Carvalho C, Artigalás O. Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type I: Laronidase. *Pediatric Health,* 2010B, 4:133–45.

Giugliani R, Federhen A, Muñoz Rojas MV, Vieira TA, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta AX, Bomfim C, Lourenço CM, Kim CA, Horovitz D, Souza DB, Norato D, Marinho D, Palhares D, Santos ES, Ribeiro E, Valadares ER, Guarany F, De Lucca GR, Pimentel H, Souza IN, Corrêa Neto J, Fraga JC, Góes JE, Cabral JM, Simeonato J, Llerena JC Jr, Jardim LB, Giuliani Lde R, Silva LC, Santos M, Moreira MA, Kerstenetzky M, Ribeiro M, Ruas N, Barrios P, Aranda P, Honjo R, Boy R, Costa R, Souza CF, Alcântara FF, Avilla SG, Fagundes S, Martins AM. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidoses I, II and VI: recommendations from a group of Brazilian F experts. *Rev Assoc Med Bras.* 2010A;56:271-7.

Giugliani R, Rojas VM, Martins AM, Valadares ER, Clarke JT, Góes JE, Kakkis ED, Worden MA, Sidman M, Cox GF. A dose-optimization trial of laronidase (Aldurazyme) in patients with mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab.* 2009 Jan;96(1):13-9. Epub 2008 Nov 26.

Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007;18(3):241-68.

Hong R, Fischer NO, Verma A, Googman CM. Control of Protein Structure and Function through Surface Recognition by Tailored Nanoparticle Scaffolds. *Journal of the American Chemical Society.* 2004;126:739-743.

Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta.* 1979, 92:257-65.

Hsu J, Serrano D, Bhowmick T, Kumar K, Shen Y, Kuo YC, Garnacho C, Muro S. Enhanced endothelial delivery and biochemical effects of  $\alpha$ -galactosidase by ICAM-1-targeted nanocarriers for Fabry disease. *J Control Release.* 2011;149:323-31.

Hu FO, Hong Y, Yuan H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International Journal of Pharmaceutics.* n. 273, p. 29-35, 2004.

- Ipe BI, Niemeyer CM. Nanohybrids composed of quantum dots and cytochrome P450 as photocatalysts. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 Jan 9;45(3):504-7.
- Kim JS, Valencia CA, Liu R, Lin W. Highly-efficient purification of native polyhistidine-tagged proteins by multivalent NTA-modified magnetic nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2007;18:333-41.
- Kim JH, Kim YS, Park K, Kang E, Lee S, Nam HY, Kim K, Park JH, Chi DY, Park RW, Kim IS, Choi K, Kwon IC. Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy. *Biomaterials.* 2008; 29:1920-1930.
- Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47:65-81.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
- Martins S, Sarmento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2007;2:595-607.
- Mengual O, Menuer G, Cayre I, Puech K, Snabre P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*, v. 152, p. 111-123, 1999a
- Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta.* 1999b;50:445-56.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983; 65: 55-63.
- Nelson DL. In: Lehninger, eds. *Biochemical Principles*, 4<sup>th</sup> edition, Sarvier. 2006;212.

- Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition. New York: McGraw-Hill, 2001;3421-3452.
- Rana S, Yeh YC, Rotello VM. Engineering the nanoparticle-protein interface: applications and possibilities. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14:828-34.
- Rempel BP, Clarke LA, Withersa SG. A homology model for human  $\alpha$ -L-iduronidase: Insights into human disease *Molecular Genetics and Metabolism* 85 (2005) 28–37
- Samanta B, Yan H, Fischer NO, Shi J, Jerry DJ, Rotello VM. Protein-passivated Fe(3)O(4) nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *J Mater Chem*. 2008;18:1204-1208.
- Siqueira NM, Contri RV, Paese K, Beck RC, Pohlmann AR, Guterres SS. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011;24:166-74.
- Souza MV, Krug BC, Picon P, Schwartz IVD. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2008, 883:1-11.
- Tan ML, Choong PFM, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. v. 31, pg. 184–193, 2010
- Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11:S81-91.

## Tables

Table 1: Average size (D[4.3]), SPAN, mean diameter, PDI and zeta potential . Data is presented as mean  $\pm$  SD, n=3 for each formulation.

Formulation	D[4.3] (nm)	SPAN	Mean diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
LNC	130 $\pm$ 2	0.9 $\pm$ 0	67 $\pm$ 5	0.12 $\pm$ 0.02	-11.1 $\pm$ 4
LNC-CS <sub>0.03</sub>	641 $\pm$ 164	2.7 $\pm$ 0.8	-	-	-
LNC-CS <sub>0.05</sub>	140 $\pm$ 8	1.2 $\pm$ 0.2	73 $\pm$ 1	0.15 $\pm$ 0.01	10.8 $\pm$ 5
LNC-CS <sub>0.075</sub>	132 $\pm$ 0	1.0 $\pm$ 0	76 $\pm$ 2	0.17 $\pm$ 0.01	16.2 $\pm$ 2

Table 2 Multiple-wall nanocapsules composition.

Formulation	Chitosan concentration	Laronidase concentration ( $\mu$ g/mL)
LNC <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	0.050%	11
LNC <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	0.050%	96
LNC <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	0.075%	11
LNC <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	0.075%	96

Table 3: Mean size (D[4.3]), SPAN, mean diameter and PDI of multiple wall lipid core nanocapsules. (n = 3 for each formulation).

<b>Formulation</b>	<b>D[4.3] (nm)</b>	<b>SPAN</b>	<b>Mean diameter (nm)</b>	<b>PDI</b>
<b>LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub></b>	134 ± 3	1.2 ± 0	71 ± 1	0.14 ± 0.01
<b>LNC<sub>1</sub>E<sub>2</sub></b>	352 ± 169	1.3 ± 0,1	-	-
<b>LNC<sub>2</sub>E<sub>1</sub></b>	1530 ± 1383	1.1 ± 0,2	-	-
<b>LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub></b>	137 ± 4	1.2 ± 0,1	79 ± 1	0.16 ± 0.01

Table 4: Catalytic properties of Laronidase and Nanostructured Laronidase.

\*p<0.05, Student t Test.

	<b>Laronidase</b>	<b>LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub></b>
<b>K<sub>m</sub> (μM)</b>	127.93 ± 38.00	105.18 ± 17.89
<b>V<sub>max</sub> (μM.s<sup>-1</sup>)</b>	1.01 ± 0.22	1.45 ± 0.16*
<b>K<sub>cat</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	36.48 ± 7.87	53.55 ± 6.07*
<b>E<sub>cat</sub> (s<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup>)</b>	0.29 ± 0.07	0.51 ± 0.06*
<b>Final product (μM)</b>	575.23 ± 70.80	753.38 ± 13.24*

## Figure Legends

Figure 1: Schematic figure of multiple wall lipid core nanocapsule coated with chitosan and  $\text{Fe}^{2+}$  ions for Laronidase linkage.

Figure 2: Particle size distribution obtained by laser diffraction. Size distribution was measured by volume and number. A. LNC; B. LNC-CS<sub>0.03</sub>; C. LNC-CS<sub>0.05</sub> and D. LNC-CS<sub>0.075</sub>. n=3 for each formulation. LNC suspension presented only nanometer particles with monomodal distribution. After chitosan coating, LNC-CS<sub>0.05</sub> and LNC-CS<sub>0.075</sub> remained in the nanometer range, while LNC-CS<sub>0.03</sub> presented a small population of particles in the micrometer scale when analysed by volume.

Figure 3: Size distribution profiles by photon correlation spectroscopy. A. As a function of intensity; B. As a function of volume and C. As a function of number. n=3 for all formulations. All formulations presented a PDI value lower than 0.2. LNC-CS<sub>0.075</sub> had a higher diameter when compared to LNC (p<0.05).

Figure 4: Particle size distribution obtained by laser diffraction. A. LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>; B. LNC<sub>1</sub>E<sub>2</sub>; C. LNC<sub>2</sub>E<sub>1</sub> and D. LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> (n=3 for each formulation). LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub> had particles in the nanometer range, LNC<sub>1</sub>E<sub>2</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>1</sub> had a small population of micrometric particles when analyzed by volume.

Figure 5. Size distribution profiles by photon correlated spectroscopy as function of intensity, volume and number. A. Laronidase and B. LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> e LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. n=3 for each formulation. Laronidase was able to chemically bind to the nanostructures (as observed by the monomodal profile of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub>).

Figure 6: Uptake mechanisms of LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>. MPS I fibroblasts were incubated with Laronidase or LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> at 37°C (control groups) and with 5mM mannose-6-phosphate or 3µg/mL Filipin or at 4°C. Intracellular enzyme activity was measured by fluorescent method, \*p<0.05 when compared to respective control group. Student t Test.

Figure 7: Clearance characteristics of Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> during 4 h after infusion in MPS I mice (0.085 µg/g of body weight, n=3/group/time). The area under the curve and the shelf-life time was over three-fold higher (p<0.01, Student t Test) for LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub>.

Figure 8: Biodistribution of Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> in MPS I mice. A. After 4 hours infusion. B. After 24 hours infusion. (0.085 µg/g of body weight, n=3/group/time). \*p<0.05 when compared to Laronidase at the same time point. Student t Test.

Supplementary figure 1: Relative backscattering profiles of multiple wall nanocapsules. A. LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and B. LNC<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Only one profile of each suspension is showed, as the three batches of each formulation presented the same destabilization pattern. Both formulations showed an increased  $\Delta BS$  signal at the base of bucket followed by a reduced sign at the top. No significant changes on  $BS$  signal were observed at the center of the cuvette.

Supplementary figure 2: Cytotoxicity analysis of Laronidase, LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC-CS<sub>0.05</sub>. Laronidase caused no cytotoxicity in any of the concentrations tested. LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and LNC-CS<sub>0.05</sub> caused about 30% cell death in higher concentrations, and reached 90-100% cell viability in lower concentrations.

Supplementary figure 3: Enzyme uptake by MPS I patient's fibroblasts. Laronidase and LNC<sub>1</sub>E<sub>1</sub> were able to be internalized restoring enzyme activity on MPS I patient's fibroblasts. \*p<0.01 compared to Control group, ANOVA with Tukey post hoc.



## Figures

Figure 1

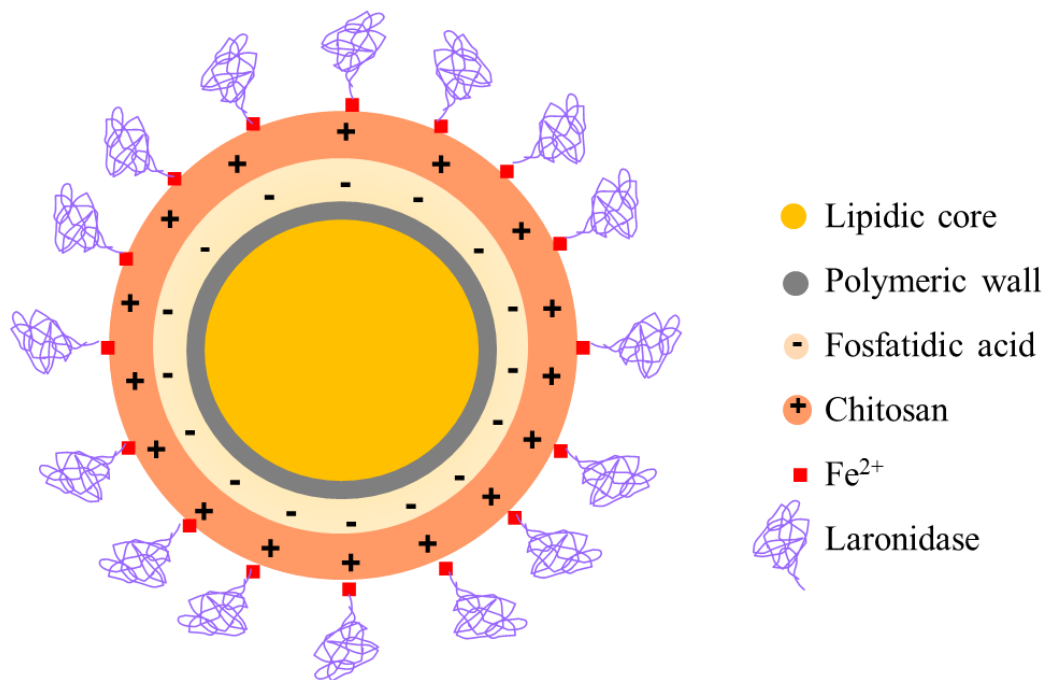


Figure 2

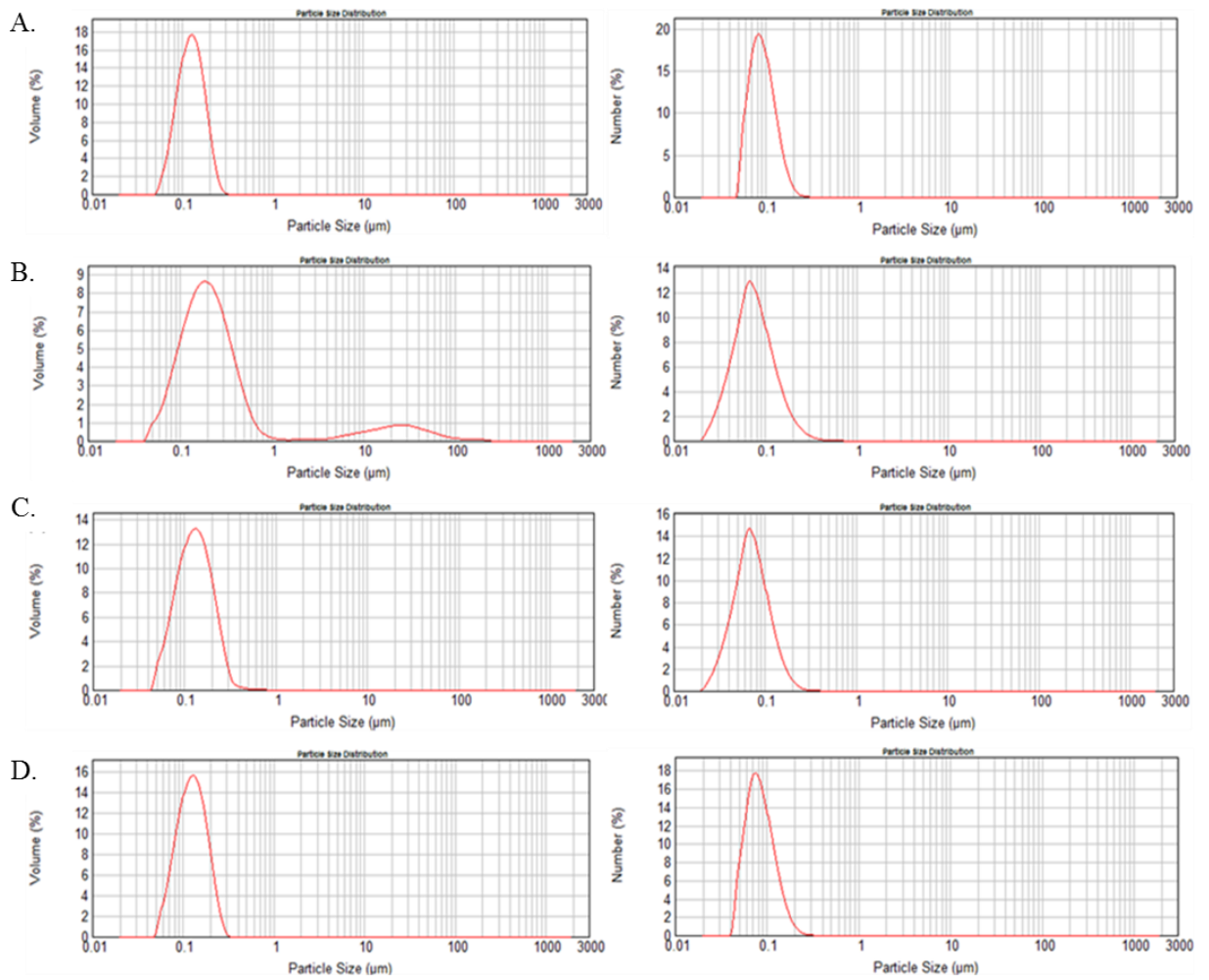


Figure 3

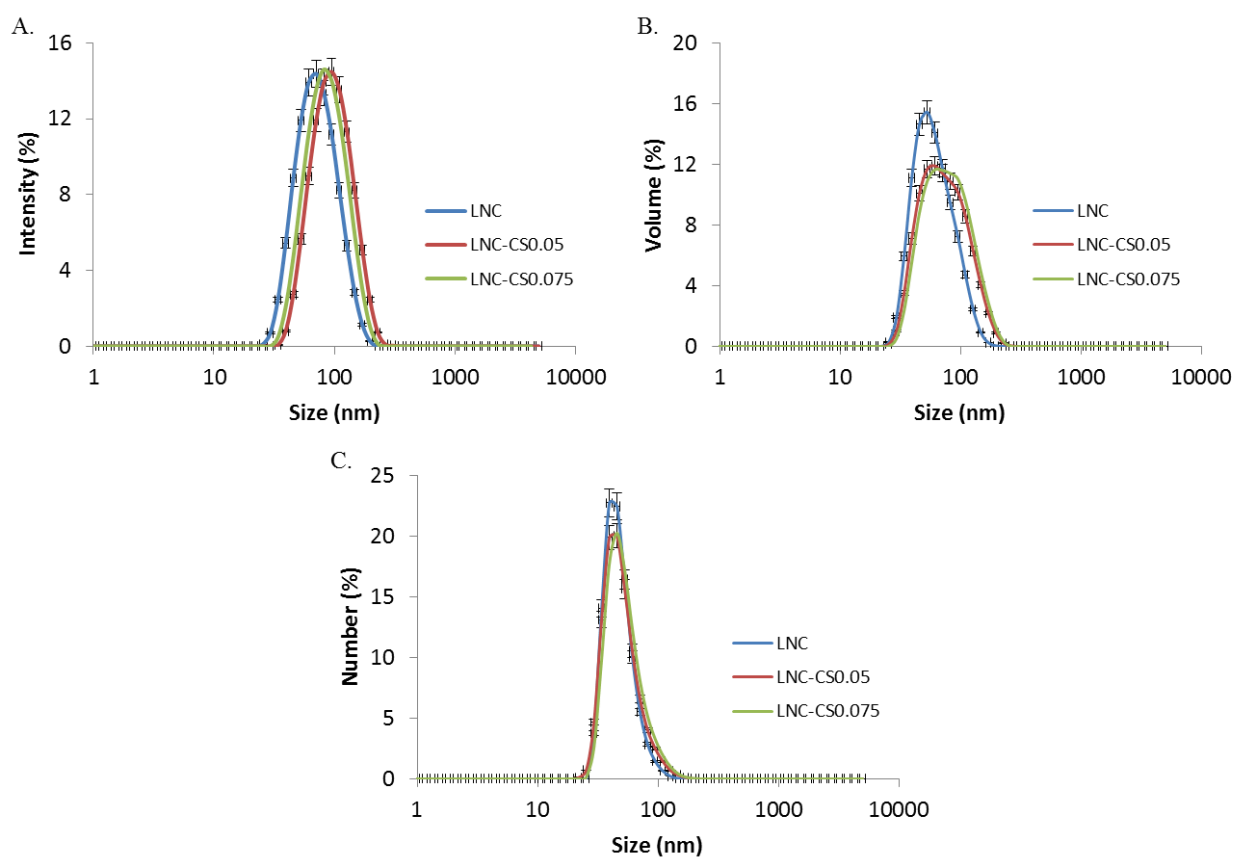


Figure 4

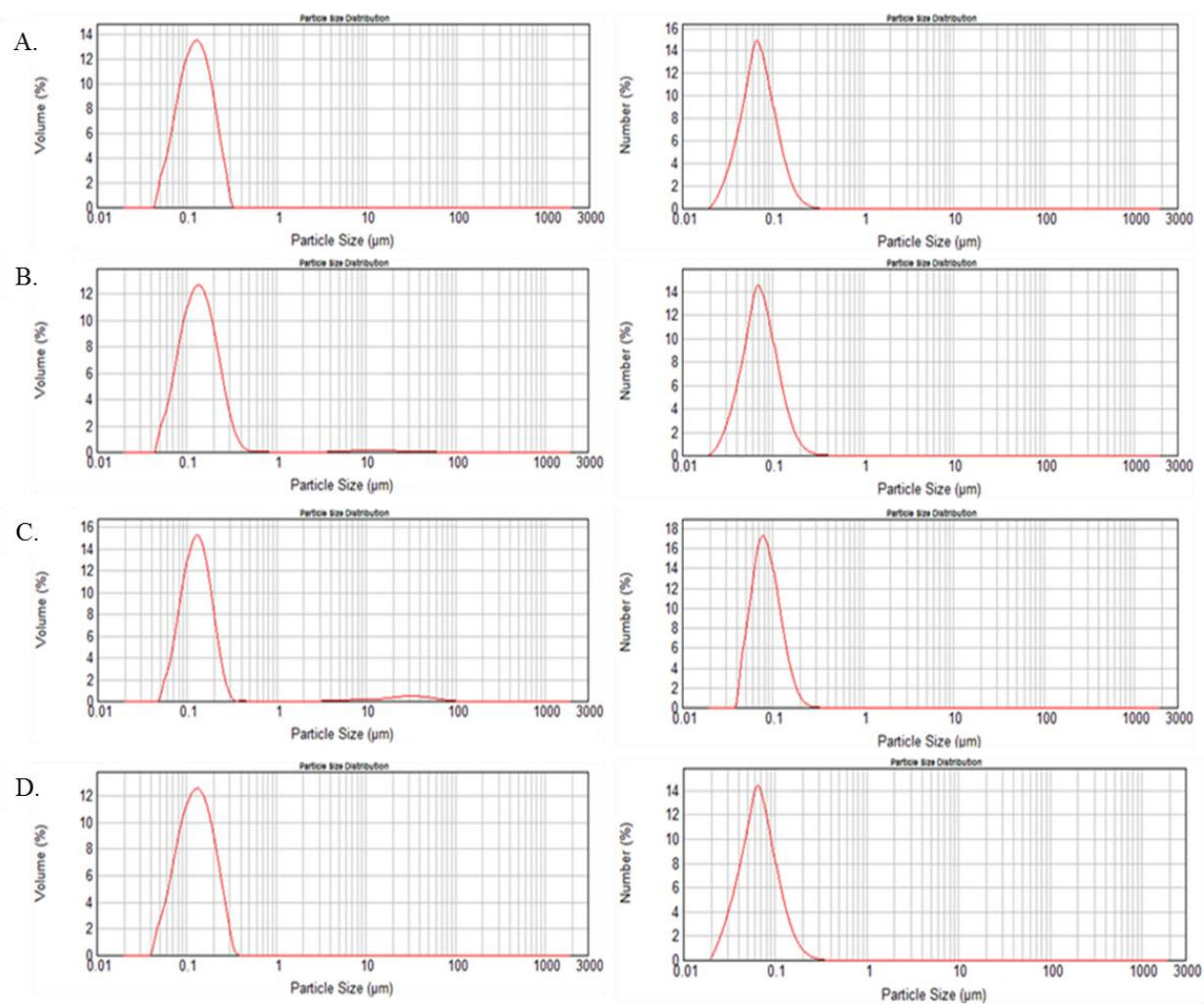
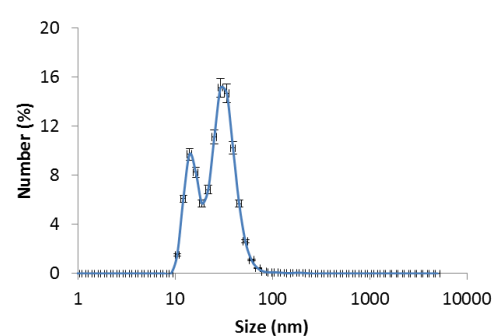
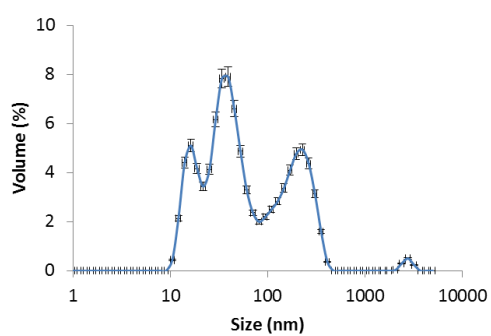
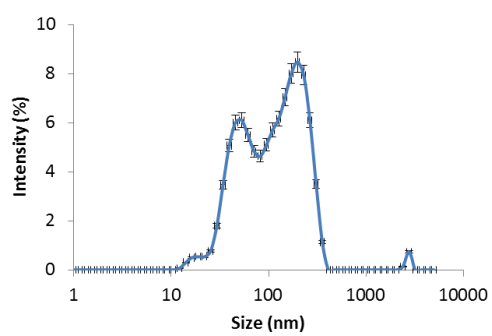


Figure 5

A.



B.

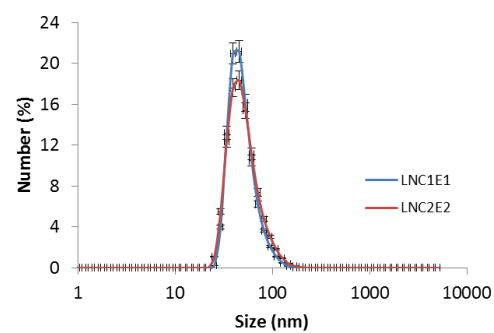
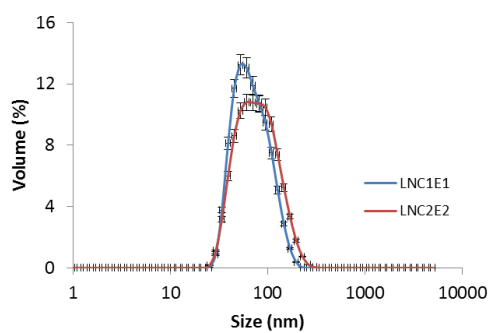
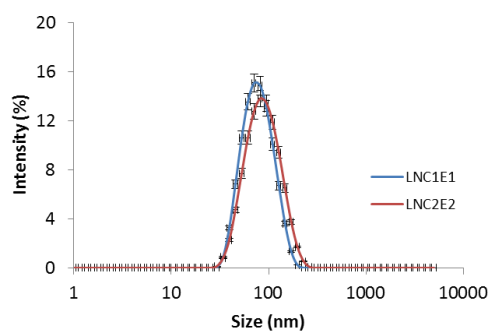


Figure 6

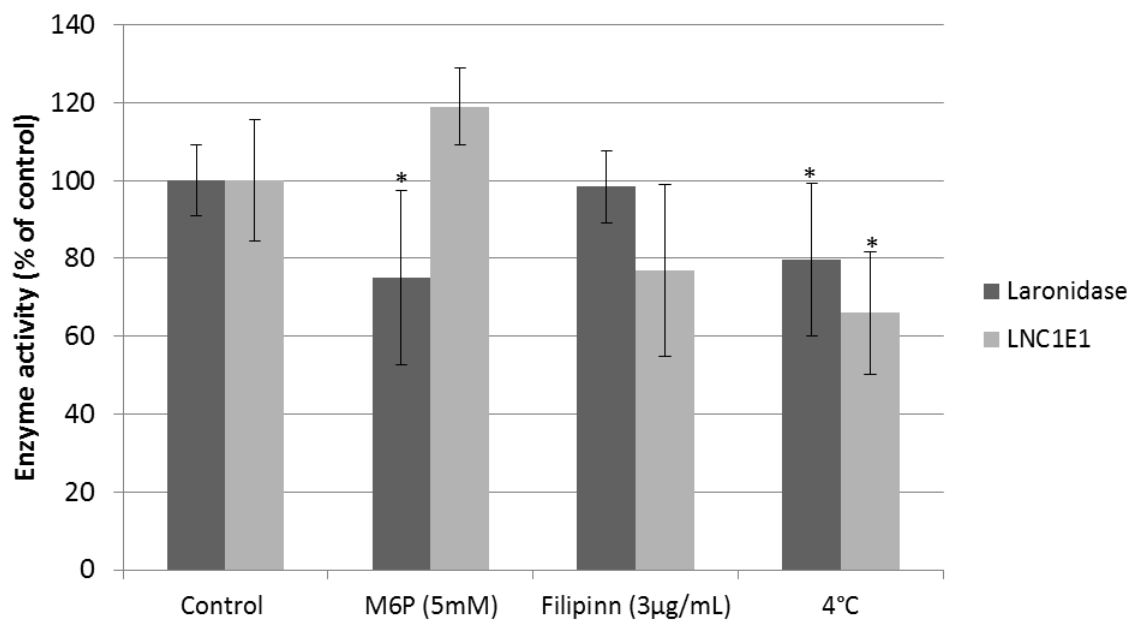
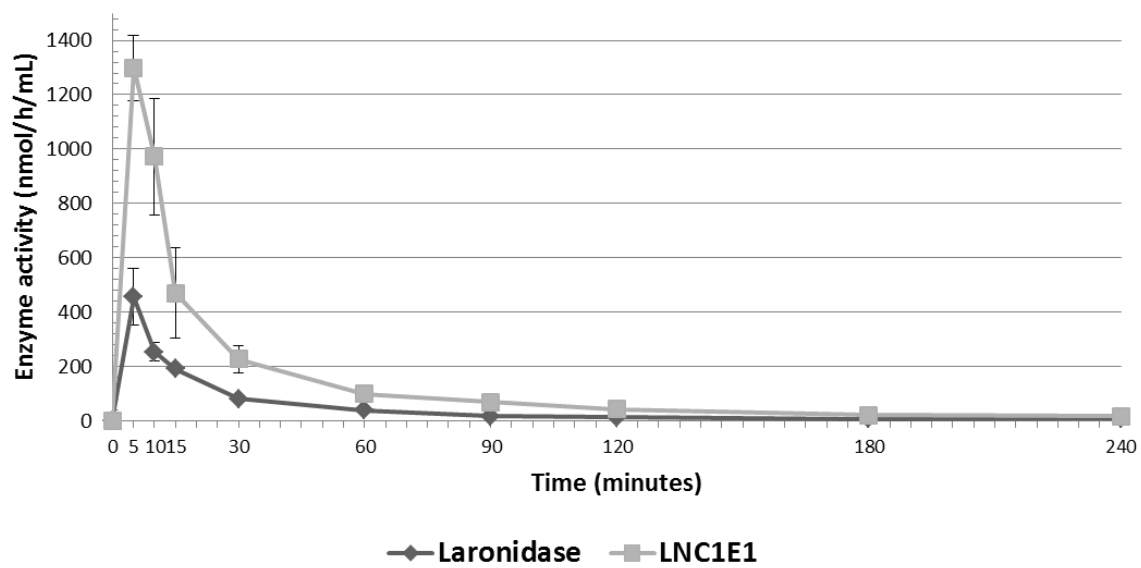
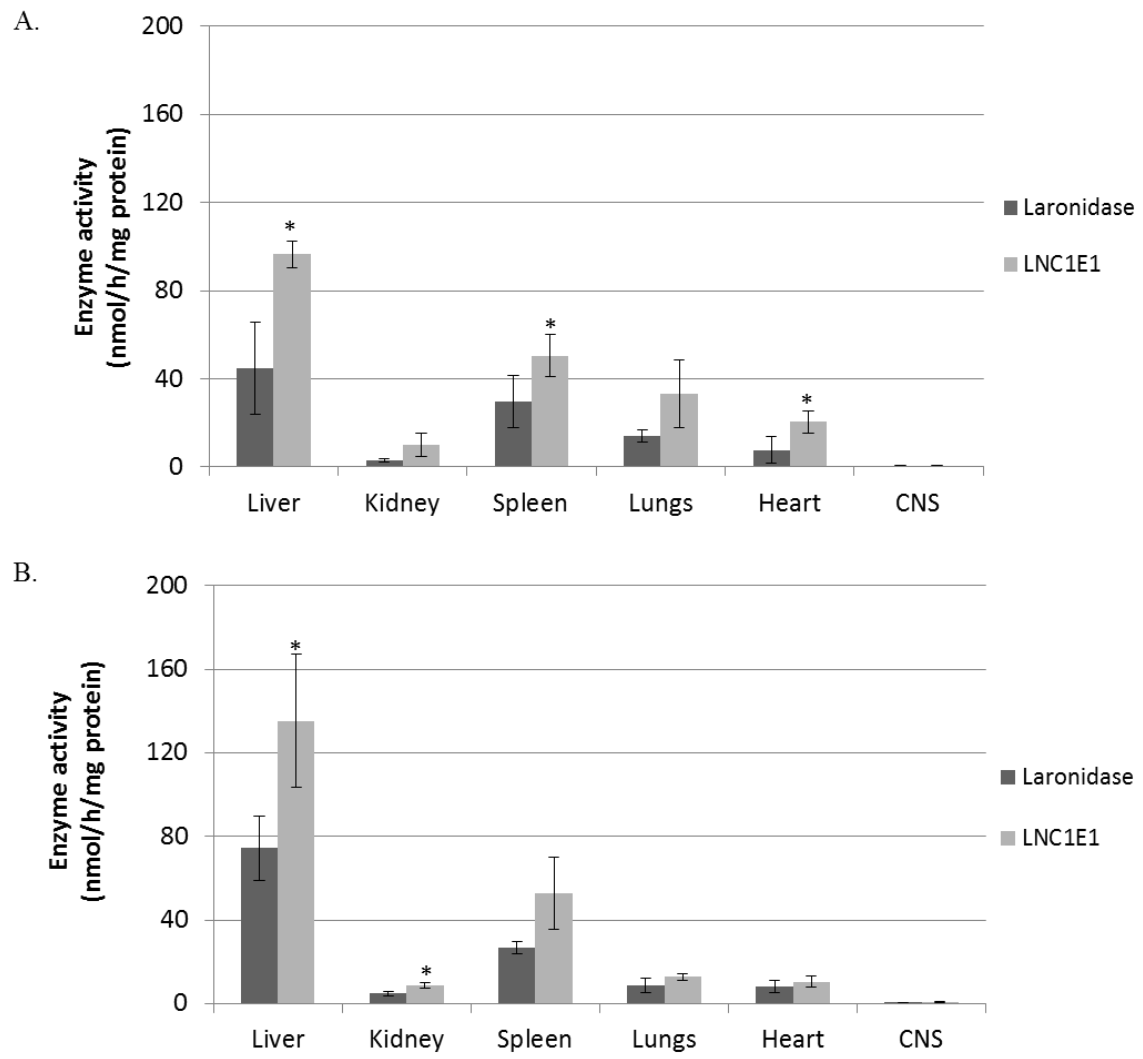


Figure 7



	Laronidase	LNC <sub>1</sub> E <sub>1</sub>
<b>Area under the curve</b>	2883.87 ± 399.18	9459.33 ± 1290.77*
<b>Shelf-life time</b>	57.95' ± 5.37'	95.44' ± 5.21'*

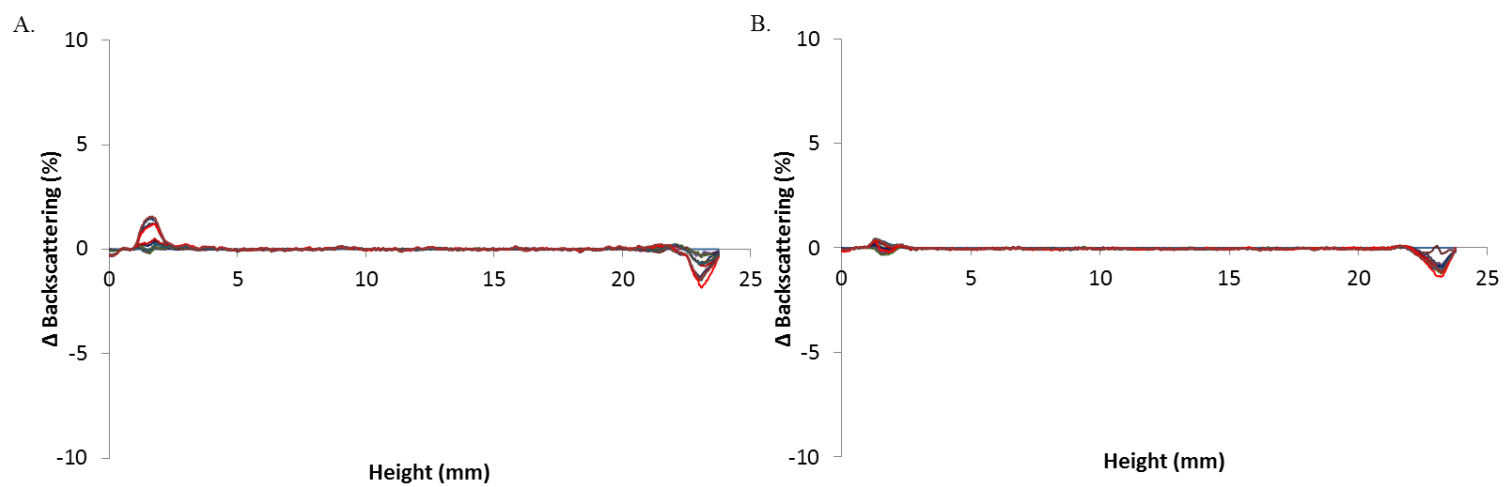
Figure 8



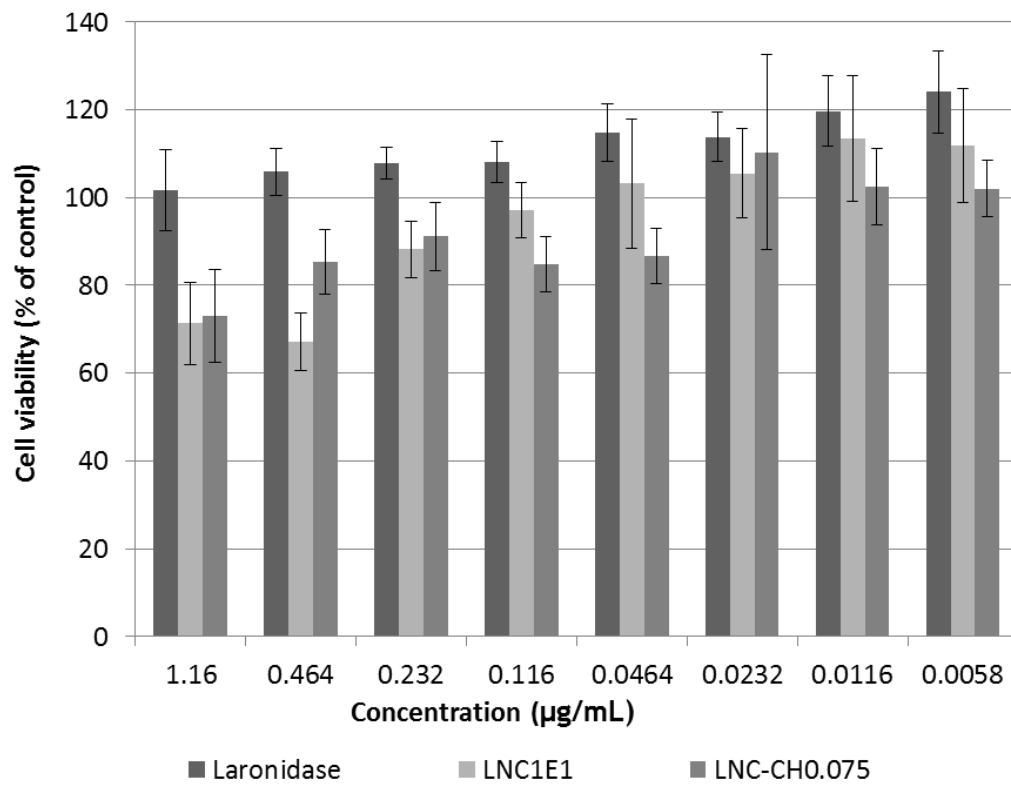


## Supplementary figures

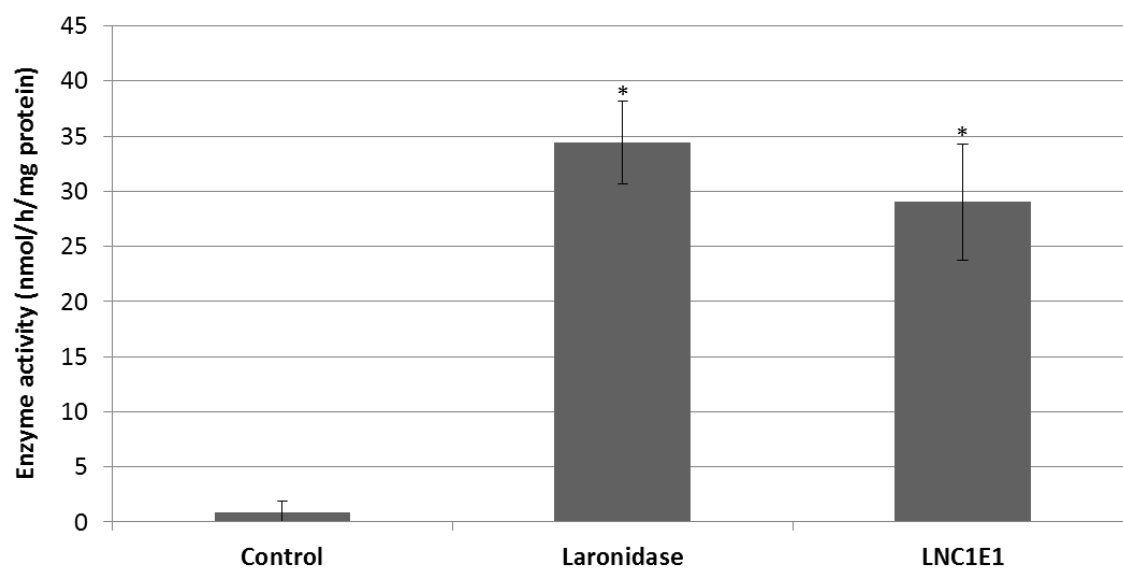
### Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



#### 4. DISCUSSÃO

A MPS I é uma doença multissistêmica e progressiva, herdada de maneira autossômica recessiva e ocorre devido a mutações no gene que codifica a enzima IDUA (Neufeld and Muenzer, 2001). A deficiência desta enzima leva ao acúmulo dos seus substratos, dermatan e heparan sulfato, o que, em conjunto com outras alterações da homeostasia lisossomal (Ballabio e Gieselmann, 2009), acarreta os diversos aspectos clínicos da doença. A maioria das enzimas lisossômicas é caracterizada por sua capacidade de ser secretadas e internalizadas por células adjacentes através dos receptores de manose-6-fosfato e os tratamentos existentes para a MPS I são baseados nessa característica.

Atualmente a TRE é o tratamento de escolha já que o transplante de células tronco hematopoiéticas possui limitações principalmente devido à morbi-mortalidade associadas e à necessidade de encontrar doadores HLA compatíveis (Bonfim *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo a TRE possui limitações uma vez que não é capaz de corrigir os sintomas neurológicos, já que a enzima não ultrapassa a barreira hematoencefálica; necessita administração de antipiréticos e anti-histamínicos, para prevenção e manejo de reações adversas que ocorrem em parcela significativa dos pacientes (Giugliani *et al.*, 2010B); além do alto custo da terapia, que representa um impacto significativo no sistema de saúde (Souza *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram estudadas duas alternativas terapêuticas para o tratamento da MPS I com o objetivo de superar as limitações dos tratamentos atuais. A primeira delas é a utilização de antibióticos para a supressão de mutações do tipo *stop codon* prematuro, aumentando a atividade de IDUA endógena dos pacientes. A segunda é a utilização da nanotecnologia para produzir, a partir da enzima disponível comercialmente, uma formulação mais eficiente que possui biodistribuição e biodisponibilidade aumentadas, podendo resultar em uma diminuição da dose e, conseqüentemente, dos efeitos adversos e do custo da TRE.

A utilização de fármacos com a finalidade de mascarar mutações sem sentido através da incorporação de um aminoácido aleatório no lugar do *stop codon* prematuro foi sugerida em 1965 (Davies *et al.*, 1965). Apesar disso, apenas recentemente, estudos nesta área tem sido realizados, alguns deles mostrando efeitos clinicamente significativos com esta abordagem (Clancy *et al.*, 2001). Neste trabalho, foi estudado o efeito do tratamento com geneticina e cloranfenicol em fibroblastos de pacientes com

MPS I. O tratamento foi realizado em células de três pacientes com diferentes genótipos, sendo um deles homozigoto para mutações sem sentido (p.W402X/p.W402X) e outros dois heterozigotos para este tipo de mutação (p.Q70X/c.1739-1g<t e p.R89W/p.W402X).

A geneticina é um antibiótico aminoglicosídeo, análogo à gentamicina, e mostrou ser superior em relação à capacidade de indução do *readthrough* traducional (Yang *et al.*, 2007). Esta classe de antibióticos é a mais estudada para fins de tradução alternativa sendo capaz de suprimir mutações de *stop codon* prematuro em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne (Barton-Davis *et al.*, 1999) e em um ensaio clínico em pacientes com Fibrose Cística (Wilschanski *et al.*, 2000).

Neste estudo o tratamento com geneticina não teve efeito sobre a atividade enzimática em nenhum dos diferentes genótipos. Uma possível explicação para a falta de efeito observada neste estudo é que os alelos com mutações sem sentido possivelmente são degradados pelo mecanismo de NMD, que é responsável pelo reconhecimento e degradação de RNA mensageiro com *stop codon* prematuro e é ativado devido ao reconhecimento de complexos protéicos das junções exon-exon que não são excisados na primeira tradução (Nagy e Maquat, 1998; Inácio *et al.*, 2004). O principal objetivo do NMD é bloquear a produção de proteínas truncadas, o que acarreta efeitos negativos sobre a função celular (Silva *et al.*, 2009). Ainda, o NMD degrada uma variedade de transcrições fisiológicas, dentre as quais estão os transcritos das regiões *upstream open-reading frame* (uORF), transcritos contendo introns nas regiões 3' não traduzidas (UTR) e transcritos derivados de *splicing* alternativo. Evidências deste mecanismo se encontram no fato de que em diversos organismos com RNA mensageiro contendo um *stop codon* prematuro, a quantidade deste RNA é mais baixa do que o normal (Zhang e Maquat, 1997).

O mecanismo desta rota está envolvido com a deposição de um complexo protéico a 20-24 nucleotídeos 5' antes de uma junção exon-exon, que ocorre durante o *splicing*. Durante a primeira tradução, o ribossomo exclui estes complexos, possibilitando a leitura de todo o RNA mensageiro. Quando há uma mutação de terminação prematura a mais de 50 nucleotídeos 5' de uma destas junções, o ribossomo não exclui o complexo, o que ativa a rota NMD (Nagy e Maquat, 1998; Inácio *et al.*, 2004). Apesar desta “regra” da proximidade com junções exon-exon, há estudos mostrando que quanto mais próximo o *stop codon* está do códon de iniciação, menor é a taxa de degradação de RNA

mensageiro contendo a mutação (Inácio *et al.*, 2004). Sendo assim, mutações sem sentido em diferentes locais do gene podem gerar RNA mensageiro com graus variados de estabilidade. Por isso, as mutações sem sentido comuns em MPS I (p.Q70X e p.W402X), podem apresentar diferenças quanto à estabilidade de seus RNAs mensageiros, o que pode trazer diferenças nas respostas ao tratamento com moléculas propostas por realizarem a tradução alternativa.

Para testar a hipótese de que os alelos com mutações sem sentido estivessem sendo degradados, o sequenciamento do cDNA das células foi realizado antes e após o tratamento com geneticina. Os resultados mostraram ausência de amplificação dos alelos com *stop codon* nas duas situações, sugerindo que o NMD ocorra mais eficientemente do que o *misreading* induzido pelo fármaco. O mecanismo de NMD já foi demonstrado em células de pacientes com os genótipos estudados (Bunge *et al.*, 1998). Além disso, existem estudos mostrando que se o NMD é altamente eficiente, o efeito do tratamento com gentamicina se torna muito baixo ou nulo (Linde *et al.*, 2007). A eficiência do NMD está relacionada não apenas à posição da mutação sem sentido, como também à variabilidade genética em relação às proteínas que fazem parte desta rota. Sendo assim, células obtidas de diferentes pacientes podem ter NMD com eficiência variável e por isso apresentar uma resposta diferente ao tratamento com geneticina. Isso pode explicar as diferenças com os resultados encontrados por Hein *et al.* (2004), que estudaram linhagens celulares expressando mutações sítio dirigidas no gene da IDUA e Keeling *et al.*, (2001) que analisaram efeitos benéficos em fibroblastos de pacientes com MPS I com o genótipo p.Q70X/p.W402X.

Outro fármaco com a propriedade de fazer o *readthrough* traducional é cloranfenicol. Ele foi o primeiro antibiótico de amplo espectro a ser utilizado clinicamente e sua ação clássica conhecida é mediada pela inibição da formação da ligação peptídica (Cundliffe 1981), uma vez que ele se liga no sítio catalítico da enzima peptidil-transferase, impedindo o reconhecimento da mesma sobre o seu substrato acceptor (Schlünzen *et al.*, 2001). Outros estudos sugerindo outros mecanismos de ação do cloranfenicol foram realizados mais recentemente e sugerem que quando ele interage com a peptidil-transferase da região da subunidade 50S do ribossomo pode afetar os mecanismos de mudança de fase de leitura e *readthrough* dos códons de parada na subunidade 30S (Thompson *et al.*, 2002).

Este foi o primeiro estudo a testar a utilização do cloranfenicol em células de pacientes com MPS I. Diferente da geneticina, o cloranfenicol teve efeito positivo em aumentar a atividade enzimática de IDUA. Este aumento foi de 100 vezes e foi observado apenas nas células com genótipo heterozigoto para mutações sem sentido, não havendo nenhuma alteração de expressão ou atividade enzimática nas células p.W402X/p.W402X ou normais. O sequenciamento do cDNA das células e a análise de expressão gênica de IDUA também foram realizados antes e após o tratamento para verificar se o mecanismo pelo qual o cloranfenicol aumentou a atividade enzimática foi relacionado à indução de *misreading*. Os resultados foram os mesmos observados para a geneticina, sugerindo que o mecanismo de ação do cloranfenicol neste caso deve ser outro que não a tradução alternativa.

Como a capacidade do cloranfenicol em interagir com o sítio catalítico da peptidil transferase é conhecida, e de acordo com os resultados observados de que a ação do cloranfenicol se deu no alelo sem *stop codon* prematuro, a hipótese sugerida é de que o cloranfenicol possa agir como uma chaperona farmacológica em relação à IDUA. Chaperonas farmacológicas são moléculas que atuam sobre enzimas mal dobradas se ligando a seu domínio catalítico induzindo uma conformação adequada, evitando assim seu endereçamento à via de degradação pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático (Fan, 2003) (Figura 5). Da mesma forma que os antibióticos que induzem o *misreading*, o efeito das chaperonas farmacológicas é dependente do genótipo do paciente, uma vez que ele é dependente da instabilidade do domínio catalítico da enzima mutada (Beck, 2010).

Se este for o caso, seria o primeiro exemplo de chaperona farmacológica em MPS I descrito na literatura. De qualquer forma, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo do efeito do cloranfenicol. Entre eles, está a análise por bioinformática do efeito da mutação p.R89W sobre a estabilidade da proteína e estudos de dinâmica molecular com o cloranfenicol. Este dado poderá predizer se o cloranfenicol possui afinidade e capacidade de se ligar e estabilizar a proteína. Indicações preliminares relativas ao tamanho da molécula sugerem que isso seja possível, entretanto uma análise completa ainda está em andamento, sendo que para isso será necessário inicialmente refinar a modelagem molecular da IDUA, uma vez que o modelo disponível é baseado em homologia. Este trabalho está sendo realizado em colaboração com o Núcleo de

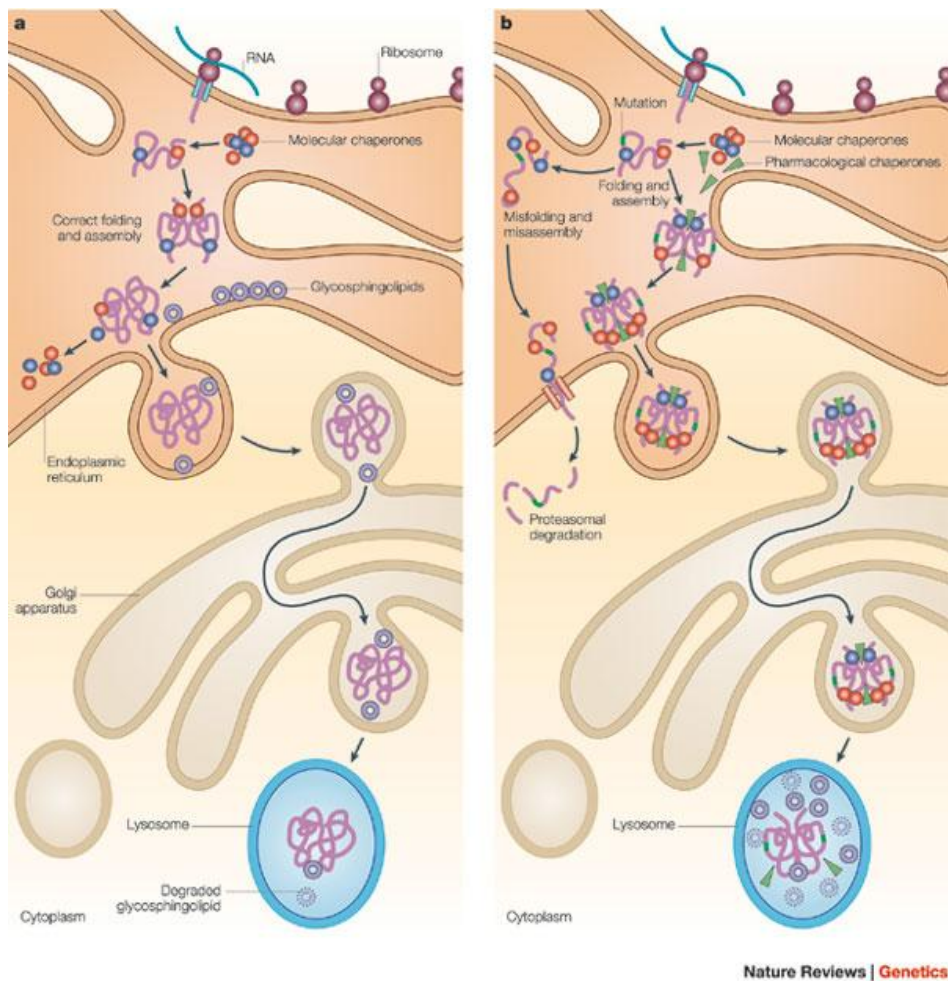


Figura 5: Mecanismo de ação de chaperonas farmacológicas. a| O processamento de uma enzima lisossômica normal. A enzima recém-sintetizada é translocada para o retículo endoplasmático onde chaperonas endógenas facilitam seu dobramento adequado. Estas chaperonas se dissociam da enzima que vai para o aparelho de Golgi e após aos lisossomos onde são estáveis e ativas devido ao ambiente ácido. b| O processamento de uma enzima mutada. Enzimas mal dobradas são degradadas pela via da ubiquitina-proteossoma no retículo endoplasmático. No entanto, existem mutações que desestabilizam a enzima sem causar alterações conformacionais no seu sítio ativo. Estas enzimas podem ser estabilizadas por chaperonas farmacológicas, que se ligam ao sítio ativo, promovendo seu dobramento. Algumas das enzimas vão aos lisossomos onde mantém baixos níveis de atividade. No lisossomo, o substrato desloca a chaperonas e se liga ao sítio ativo para ser hidrolisado. Adaptado de Desnick e Schuchman, 2002.



A outra estratégia utilizada neste estudo foi a vetorização da enzima comercialmente disponível em uma formulação de base nanotecnológica. O principal tratamento da MPS I se baseia na administração da enzima recombinante (Laronidade), a qual está aprovada para uso pelas principais agências internacionais, incluindo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicine Evaluation Agency* (EMA).

O sistema proposto neste estudo é uma nanocápsula de núcleo lipídico com paredes múltiplas revestidas com Laronidase. O desenvolvimento e caracterização físico-química do sistema foram realizados pelo grupo do Laboratório de Micro e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A suspensão final utilizada para a caracterização biológica passou por todas as etapas de análise físico-química. As nanocápsulas tiveram tamanho restrito à escala nanométrica, sendo este um fator importante para que as nanoestruturas sejam biocompatíveis. Além disso, a enzima se ligou completamente à nanocápsula, mostrando uma alta afinidade pelos íons  $Fe^{2+}$ . Esta ligação se deu devido às interações eletrostáticas entre o metal e os grupamentos funcionais  $NH_2$  e  $SH$  presentes nos aminoácidos da proteína (Rana *et al.*, 2010; Samanta *et al.*, 2008). Após a nanoestruturação da enzima, o pH se manteve baixo, o que é um aspecto positivo para a manutenção da atividade ótima da Laronidase (Nelson *et al.*, 2006; Hopwood *et al.*, 1979). Além disso, as nanocápsulas revestidas com Laronidase se mantiveram estáveis ao longo do tempo.

A caracterização biológica da Laronidase nanoestruturada ( $LNC_1E_1$ ) foi realizada inicialmente com a caracterização das suas propriedades catalíticas. A nanoestruturação modificou estas propriedades, aumentando a velocidade máxima da reação e a eficiência catalítica da enzima, ou seja, a partir de uma mesma concentração de substrato, a enzima nanoestruturada produziu maior quantidade de produto, mostrando ser mais eficiente do que a enzima na sua forma original. Sistemas nanocarreadores podem ser utilizados para melhorar as propriedades de enzimas, devido a seu tamanho e propriedades físicas (Ipe and Niemeyer, 2006). No entanto, pode haver diminuição da atividade enzimática, dependendo do tipo de interação que ocorre da enzima com o nanocarreador (de Graaf *et al.*, 2009). Se a interação se der com o sítio ativo da enzima ou de maneira que a torne rígida, ela pode perder a eficiência. O sistema utilizado neste trabalho se baseia na ligação não covalente entre um metal de transição e grupamentos

imidazólicos dos aminoácidos (Kim *et al.*, 2007). Embora o sítio ativo de IDUA possua resíduos de histidina (Rempel *et al.*, 2005), a interação com o  $\text{Fe}^{2+}$  provavelmente ocorreu em regiões inertes da enzima. Após a nanoestruturação, a Laronidase permaneceu capaz de ser internalizada por células de pacientes e de reverter a deficiência enzimática nas mesmas. Entretanto, ao contrário do que é observado em relação à enzima livre, a Laronidase nanoestruturada foi internalizada por outros receptores além dos de manose-6-fosfato. Ao contrário do que se hipotetizava, esta via de internalização não foi por difusão passiva e sim por transporte ativo.

Diversos nanomateriais tem sido empregados nos campos industriais, farmacêutico e médico. Existem evidências de que as características específicas e únicas destes nanomateriais podem apresentar risco potencial à saúde humana (Nel *et al.*, 2006). Dentre as características que interferem na citotoxicidade de nanomateriais encontram-se seu tamanho e composição (Sohaebuddin *et al.*, 2010). Estudos mostram que a exposição de células e animais a nanopartículas de quartzo, de alguns minerais ou de fibras de amianto podem induzir dano oxidativo, inflamação, fibrose e citotoxicidade (Oberdörster *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* geralmente predizem as respostas fisiopatológicas encontradas posteriormente em modelo animal, como por exemplo, morte celular mediada por estresse oxidativo. Entretanto, a causa da citotoxicidade mediada por nanopartículas pode ser dependente de dano ao DNA e apoptose (Sohaebuddin *et al.*, 2010). No presente trabalho, a avaliação da citotoxicidade mostrou que não houve morte celular na dose subsequentemente utilizada para os testes *in vivo*.

A partir dos resultados favoráveis observados nos experimentos *in vitro*, procedeu-se a uma análise preliminar *in vivo* em modelo animal de MPS I. Além das propriedades catalíticas superiores, os estudos de farmacocinética e biodistribuição mostraram também uma superioridade da Laronidase nanoestruturada em relação à livre. O *clearance* foi mais lento, mostrando uma maior biodisponibilidade da enzima e a atividade enzimática nos órgãos foi maior tanto em 4 como em 24 horas. É importante ressaltar que a dose utilizada foi de 0,085  $\mu\text{g/g}$  peso tanto para Laronidase quanto para a enzima nanoestruturada. Esta dose é 14 vezes menor que a dose usual de Laronidase utilizada em pacientes (1,2  $\mu\text{g/g}$  peso) e foi determinada a partir da concentração ótima de enzima para o preparo da formulação nanoestruturada (11  $\mu\text{g/mL}$ ) e considerano um volume de injeção de 200  $\mu\text{L}$  em animais de aproximadamente 25 g. Estudos comparando a biodistribuição e os níveis de atividade tecidual da enzima

nanoestruturada nesta dose com a enzima livre na dose usual estão previstos para serem realizados assim que houver disponibilidade de animais homozigotos *Idua*<sup>-/-</sup>.

A nanoestruturação de enzimas é uma abordagem relativamente recente, principalmente no que diz respeito a enzimas lisossômicas. Em 2008, Garnacho e colaboradores utilizaram nanoestruturas poliméricas marcadas com anti-ICAM-1 para nanoestruturar a enzima esfingomielinase ácida. Eles mostraram um aumento do acúmulo das nanoestruturas em relação à enzima livre no rim, coração, fígado, baço e pulmão, mostrando que os nanocarreadores marcados com ICAM-1 melhoraram o perfil de biodistribuição em relação à enzima livre (Garnacho *et al.*, 2008). Outra enzima lisossômica nanoestruturada com nanocarreadores marcados com anti-ICAM-1 foi a alpha-galactosidase que foi testada no modelo murino de Doença de Fabry mostrando maior entrega da enzima no cérebro, rim, coração, fígado, pulmão e baço, bem como nas células do endotélio vascular. Estas abordagens diferem da aqui proposta por utilizarem uma molécula para direcionamento da enzima ao endotélio vascular. No nosso estudo optamos por uma formulação na qual a enzima interage com um metal, sem um ligante para direcionamento tecidual.

Os próximos passos no desenvolvimento deste trabalho é o tratamento em longo prazo com a formulação nanoestruturada para comparação da segurança e eficácia terapêutica. Cabe ressaltar que estudos de toxicidade, com avaliação de parâmetros séricos e urinários não foram realizados nestes animais, pois estavam fora do escopo deste estudo inicial. Entretanto, um dos animais tratado com a forma nanoestruturada apresentou hematúria e teve seu rim coletado para análise histológica, que não evidenciou nenhuma lesão grave, apenas degeneração hidrópica, congestão e cilindros hemáticos, que também estavam presentes nos animais tratados com a enzima livre, ainda que em menor grau. Seria necessário um tempo maior de observação para determinar se estas lesões teriam resolução espontânea, necessitariam de tratamento ou evoluiriam para um quadro mais grave. Mais uma vez, estudos dirigidos para avaliar a segurança da formulação são necessários. Por outro lado, a avaliação da eficácia deverá ser realizada em comparação com a enzima livre. Nosso grupo já possui animais tratados com TRE na forma convencional e no período neonatal, que não apresentaram reações adversas e possuem dados de eficácia documentada (Baldo, *comunicação pessoal*).

Uma das hipóteses prévias a este trabalho seria que a enzima nanoestruturada adquirisse a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Entretanto, não houve diferença em relação à atividade enzimática em diferentes estruturas do SNC. Isso pode ser explicado pelo fato de que a enzima nanoestruturada não é internalizada por difusão passiva, sendo ainda dependente de transporte ativo. No entanto, o sistema proposto pode melhorar outras limitações da TRE como a necessidade de altas doses, o que pode estar relacionado ao desencadeamento de resposta imunológica. Esta possível diminuição de dose pode ainda resultar em uma redução de custos para o Sistema Público de Saúde, possibilitando uma disponibilidade mais imediata do tratamento aos pacientes.

Diversas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças lisossômicas têm sido estudadas. A terapia gênica é uma delas e resultados animadores têm sido obtidos em relação à reversão do fenótipo clínico. Para a MPS I existem protocolos pré-clínicos com diferentes vetores e que mostram resultados bons, porém com algumas limitações, como a resposta imunológica e a perda de expressão, a serem superadas (Liu *et al.*, 2005; Di Domenico *et al.*, 2005). Mais recentemente, um protocolo de terapia gênica mostrou-se eficiente em prevenir o aparecimento dos sintomas neurológicos quando altos níveis (mais de 40 vezes em relação ao normal) de atividade de IDUA eram atingidos (Wolf *et al.*, 2011). Embora os resultados com terapia gênica sejam promissores, existem os problemas relacionados à biossegurança que dificultam a sua transposição para a clínica.

Outras abordagens como a microencapsulação celular, inibição de síntese de substrato, chaperonas farmacológicas e fármacos que fazem o *misreading* são estudadas e mostram efeitos positivos, porém as abordagens citadas levam em consideração apenas um aspecto da doença, por isso, a combinação de diversas terapias deve ter um efeito melhor do que cada uma isoladamente (Beck, 2010). Evidências disso foram mostradas em um modelo animal de Gangliosidose GM2, no qual a combinação da terapia de redução do substrato com o transplante de células tronco hematopoiéticas teve um efeito sinérgico (Jeyacumar *et al.*, 2001). Outro estudo mostra que a combinação da TRE com a terapia de redução do substrato tem um efeito positivo em pacientes com Doença de Gaucher (Schiffmann *et al.*, 2008). Ambos os estudos citados utilizam uma das terapias disponíveis clinicamente e utilizam como adjuvante outra forma de tratamento.

As estratégias estudadas no presente trabalho utilizam fármacos já aprovados pela ANVISA para a utilização na clínica. Por isso sua aplicabilidade terapêutica se torna mais factível. No primeiro estudo, observou-se um aumento de 100 vezes na atividade enzimática endógena de IDUA após o tratamento com cloranfenicol, levando a níveis de atividade entre 25% e 50% dos valores normais. Sabe-se que uma atividade enzimática entre 15% e 20% dos níveis normais pode ser suficiente para gerar uma eficácia clínica (Sands e Davidson, 2006), embora diferentes sistemas do organismo precisem de maiores quantidades de enzima para ser corrigidos (Cotugno *et al.*, 2010). A utilização do cloranfenicol como tratamento único possivelmente não seria eficaz, mas poderia ser utilizado como um adjuvante à TRE com a vantagem de que o cloranfenicol é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, podendo ter efeitos em relação ao comprometimento neurológico dos pacientes graves.

No segundo estudo, a formulação comercial já utilizada para a terapia de reposição enzimática foi modificada para melhorar as propriedades da enzima e possibilitar uma redução de dose. Esta estratégia pode futuramente ser testada quanto à dose necessária para atingir o mesmo efeito terapêutico da TRE tradicional e quanto à indução de resposta imunológica em modelo animal. Além disso, a nanoestrutura pode ser modificada para atingir tecidos específicos, de difícil acesso como osso, cartilagem e SNC. Finalmente, o sistema utilizado pode ser aplicado a outras DL para as quais existam enzimas comercialmente disponíveis.

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusão geral

A conclusão geral do primeiro estudo é que a resposta ao tratamento com geneticina é dependente do genótipo do paciente e da eficiência do NMD e que o efeito positivo do cloranfenicol em aumentar a atividade de IDUA nas células de pacientes com MPS I não se dá devido ao aumento da expressão gênica nem ao mecanismo de *readthrough*. A conclusão geral do segundo estudo é que a nanoestruturação de Laronidase melhora as propriedades catalíticas da enzima, aumentando sua eficiência da *in vitro* e *in vivo*, o que cria a possibilidade de redução da dose e, como consequência, dos efeitos colaterais da TRE clássica. Entretanto a vetorização utilizada não permitiu o acesso da enzima ao SNC.

### 5.2. Conclusões

#### Estudo 1

- 5.2.1. Fibroblastos de pacientes com MPS I com três genótipos diferentes foram tratados com geneticina ou cloranfenicol. A atividade enzimática de IDUA após os tratamentos aumentou apenas nos pacientes heterozigotos para mutações do tipo *stop codon* prematuro tratados com cloranfenicol.
- 5.2.2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com geneticina ou cloranfenicol em relação à expressão gênica de IDUA.
- 5.2.3. Através do sequenciamento de cDNA foi observado que os únicos alelos amplificados foram aqueles que não possuíam mutações de *stop codon* prematuro, sugerindo que este alelo é alvo do NMD neste grupo de pacientes. Após o tratamento com geneticina ou cloranfenicol não houve diferença quanto a este resultado, indicando que o efeito observado do cloranfenicol em aumentar a atividade enzimática nos heterozigotos está relacionado ao alelo que não possui *stop codon* prematuro.

## Estudo 2

- 5.2.4. Não houve diferença entre o Km da Laronidase nanoestruturada e livre, porém, a velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ), a constante catalítica ( $K_{cat}$ ) e a quantidade de produto formado foram maiores para a enzima nanoestruturada, mostrando maior eficiência na catalisação do substrato.
- 5.2.5. Tanto a Laronidase nanoestruturada, quanto a nanoestrutura branca não causaram citotoxicidade grave em fibroblastos de pacientes com MPS I.
- 5.2.6. Não houve diferença na quantidade de Laronidase livre ou nanoestruturada captada por fibroblastos de pacientes com MPS I, entretanto a captação da Laronidase nanoestruturada ocorre através de transporte ativo mediado por clatrina, mas não limitado aos receptores de manose-6-fosfato como ocorre com a enzima livre.
- 5.2.7. Animais *Idua*<sup>-/-</sup> foram tratados com Laronidase livre ou nanoestruturada. A enzima nanoestruturada teve maior tempo de meia vida e maior área sob a curva, mostrando ter maior biodisponibilidade em relação à enzima livre.
- 5.2.8. A atividade enzimática da Laronidase nanoestruturada no fígado, baço e coração foi maior do que a da enzima livre em 4 h. Em 24 h, a atividade manteve-se maior no fígado e no rim. Não houve diferença em relação à atividade enzimática no Sistema Nervoso Central, tanto em 4 h como em 24 h após a injeção.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006, 7:41-53.
- Adair JH, Parette MP, Altinoğlu EI, Kester M. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS Nano.* 2010 28;4:4967-70.
- Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, Ahuja A, Akbar M. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2010;40:385-403.
- Anfinsen, C.B. e Scheraga, H.A. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.* 1975; 29:205–300
- Ansari NH, He Q, Cook JD, Wen J, Srivastava SK. Delivery of liposome-sequestered hydrophobic proteins to lysosomes of normal and Batten disease cells. *J Neurosci Res.* 1997;47:341-7.
- Asheuer, M., Pflumio, F., Benhamida, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Fouquet, F., Imai, Y., Aubourg, P., and Cartier, N. Human CD341 cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101:3557–3562.
- Baldo G, Mayer FQ, Dilda A, Burin M, Matte U, Giugliani R. Long-term reestablishment of alpha-L-iduronidase activity in MPS I fibroblasts after non-viral gene transfer. 2011A. Personal communication.
- Baldo G, Mayer FQ, Burin M, Carrillo-farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human MPS I cells. 2011B. *Cells Tissues Organs*, *in press*.
- Ballabio, A. and Gieselmann, V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1793:684–696.
- Barsoum SC, Milgram W, Mackay W, Coblenz C, Delaney KH, Kwiecien JM, Kruth SA, Chang PL. Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med.* 2003;142:399-413.



- Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375–381.
- Beck M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*. 2010;62:33-40.
- Beiguelman B. A dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 286.
- Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiro F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AM. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*. 2009;281:53-63.
- Biffi, A., Capotondo, A., Fasano, S., del Carro, U., Marchesini, S., Azuma, H., Malaguti, M. C., Amadio, S., Brambilla, R., Grompe, M., Bordignon, C., Quattrini, A., and Naldini, L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.* 2006;116:3070–3082.
- Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther*. 2004;15:968-75.
- Bonfim C, Koliski A, Bitencourt M, Setubal D, Funke V, Ruiz J, Coutinho E, Oliveira M, Medeiros L, Zanis-Neto J, Medeiros CR, cat I, Pasquini R. Stem cell Transplantation for inborn errors of metabolism: a single center experience in 20 patients. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2007;1:52.
- Braunlin EA, Stauffer NR, Peters CH, Bass JL, Berry JM, Hopwood JJ, Krivit W. Usefulness of Bone Marrow Transplantation in the Hurler Syndrome. *Am J Cardiol*, 2003; 92:882-88.
- Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA, Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics,

immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1407:249-56.

Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:26-30.

Carvalho TG. Células microencapsuladas em alginato de cálcio: avaliação de parâmetros in vitro e in vivo. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cattaneo AG, Gornati R, Sabbioni E, Chiriva-Internati M, Cobos E, Jenkins MR, Bernardini G. Nanotechnology and human health: risks and benefits. *J Appl Toxicol*. 2010;30:730-44.

Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin–proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Cell Death Differ*. 2005; 12:1178–1190.

Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Bossy L, Kosinski M, Gurny R, Delie F. Nanomedicines for active targeting: physico-chemical characterization of paclitaxel-loaded anti-HER2 immunonanoparticles and in vitro functional studies on target cells. *Eur J Pharm Sci*. 2009;38:230-7.

Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1683-92.

Colombo M & Cabello F. Errores innatos del metabolismo lisosomal. In: Colombo MC, Cornejo VE, Raimann EB (eds) *Errores innatos en el metabolismo del niño*, 2003; 2th ed. Santiago de Chile.

Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol*. 2008;36:97-103.

- Cotugno G, Tessitore A, Capalbo A, Annunziata P, Strisciuglio C, Faella A, Aurilio M, Di Tommaso M, Russo F, Mancini A, De Leonibus E, Aloj L, Auricchio A. Different serum enzyme levels are required to rescue the various systemic features of the mucopolysaccharidoses. *Hum Gene Ther.* 2010;21:555-69.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebíček M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet.* 2000 29;355:1481-5.
- Cundliffe, E. Antibiotic inhibitors of ribosome function. In *The Molecular Basis of Antibiotic Action* (Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H. & Waring, M. J., eds), 1981;402, Wiley, London.
- de Graaf AJ, Kooijman M, Hennink WE, Mastrobattista E. Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation. *Bioconjug Chem.* 2009;20:1281-95.
- Desnick RJ, Schuchman EH. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Rev Genet.* 2002;3:954-66.
- Di Domenico C, Villani GR, Di Napoli D, Reyero EG, Lombardo A, Naldini L, Di Natale P. Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum Gene Ther.* 2005;16:81-90.
- Dietz HC. New therapeutic approaches to mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2010;363:852-63.
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., and Edelstein, R. M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. *J Gene Med* 2004; 6, 597-602.
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science.* 1999;286:1882-8.
- Fahnehjelm KT, Törnquist AL, Malm G, Winiarski J. Ocular findings in four children with mucopolysaccharidosis I-Hurler (MPS I-H) treated early with haematopoietic stem cell transplantation. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84:781-5.

- Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med.* 1999;5:112-5.
- Fan JQ. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:355-60.
- Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18:565-71.
- Frustaci A, Chimenti C, Ricci R, Natale L, Russo MA, Pieroni M, Eng CM, Desnick RJ. Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N Engl J Med.* 2001;345:25-32.
- Gabrielli O, Clarke LA, Bruni S, Coppa GV. Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up. *Pediatrics.* 2010;125:183-7.
- Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm.* 2005;298:274-92.
- Garnacho C, Dhimi R, Simone E, Dziubla T, Leferovich J, Schuchman EH, Muzykantov V, Muro S. Delivery of acid sphingomyelinase in normal and niemann-pick disease mice using intercellular adhesion molecule-1-targeted polymer nanocarriers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:400-8.
- Gelperina S, Maksimenko O, Khalansky A, Vamchugova L, Shipulo E, Abbasova K, Berdiev R, Wohlfart S, Chepurnova N, Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74:157-63.
- Giannotti MI, Esteban O, Oliva M, García-Parajo MF, Sanz F. pH-Responsive Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complexes As Nanocarriers for Lysosomal

Delivery of Therapeutic Proteins. *Biomacromolecules*. 2011 Jun 6. [Epub ahead of print].

Giugliani R, Federhen A, Muñoz Rojas MV, Vieira TA, Artigalás O, Pinto LL, Azevedo AC, Acosta AX, Bomfim C, Lourenço CM, Kim CA, Horovitz D, Souza DB, Norato D, Marinho D, Palhares D, Santos ES, Ribeiro E, Valadares ER, Guarany F, De Lucca GR, Pimentel H, Souza IN, Corrêa Neto J, Fraga JC, Góes JE, Cabral JM, Simeonato J, Llerena JC Jr, Jardim LB, Giuliani Lde R, Silva LC, Santos M, Moreira MA, Kerstenetzky M, Ribeiro M, Ruas N, Barrios P, Aranda P, Honjo R, Boy R, Costa R, Souza CF, Alcântara FF, Avilla SG, Fagundes S, Martins AM. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidoses I, II and VI: recommendations from a group of Brazilian F experts. *Rev Assoc Med Bras*. 2010A;56:271-7.

Giugliani R, Federhen A, Carvalho C, Artigalás O. Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type I: Laronidase. *Pediatric Health*, 2010B, 4:133–45.

Göppert TM, Müller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. *Journal of Drug Targeting*. 2005;13:179–87.

Gregersen N, Bross P, Andrese BS, Pedersen CB, Corydon TJ, Bolund L. The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24:189-212.

Hall, C.W., Liebaers, I., Di Natale, P., and Neufeld, E.F. Enzymatic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymol* 1978; 50: 439.

Hartung SD, Frandsen JL, Pan D, Koniar BL, Graupman P, Gunther R, Low WC, Whitley CB, McIvor RS. 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. *Molecular Therapy*. 2004, 9:866-875.

- Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA. Alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol.* 2004;338:453-62.
- Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, Byrom N, Henry K, Lucas C, Benson B, Tansley L, Patrick A, Mossman J, Young E. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1981; 2:709-712.
- Hopwood JJ, Muller V, Smithson A, Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta.* 1979, 92:257-65.
- Hopwood JJ, Morris CP. The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med.* 1990;7:381-404.
- Hsu J, Serrano D, Bhowmick T, Kumar K, Shen Y, Kuo YC, Garnacho C, Muro S. Enhanced endothelial delivery and biochemical effects of  $\alpha$ -galactosidase by ICAM-1-targeted nanocarriers for Fabry disease. *J Control Release.* 2011;149:323-31.
- Hu FO, Hong Y, Yuan H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International Journal of Pharmaceutics.* n. 273, p. 29-35, 2004.
- Inácio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, Faustino P, Lavinha J, Liebhaber SA, Romão L. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. *J Biol Chem.* 2004 30;279:32170-80.
- Ipe BI, Niemeyer CM. Nanohybrids composed of quantum dots and cytochrome P450 as photocatalysts. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006 Jan 9;45(3):504-7.
- Ishii S, Yoshioka H, Mannen K, Kulkarni AB, Fan JQ. Transgenic mouse expressing human mutant alpha-galactosidase A in an endogenous enzyme deficient background: a biochemical animal model for studying active-site specific chaperone therapy for Fabry disease. *Biochim Biophys Acta.* 2004 5;1690:250-7.

- Jeyakumar M, Norflus F, Tiftt CJ, Cortina-Borja M, Butters TD, Proia RL, Perry VH, Dwek RA, Platt FM. Enhanced survival in Sandhoff disease mice receiving a combination of substrate deprivation therapy and bone marrow transplantation. *Blood*.2001;97:327–329.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med*. 2001;344:182-8.
- Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet*. 2001 1;10:291-9.
- Kim JS, Valencia CA, Liu R, Lin W. Highly-efficient purification of native polyhistidine-tagged proteins by multivalent NTA-modified magnetic nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2007;18:333-41.
- Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*. 1999;79:S167-73.
- Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47:65-81.
- Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet*. 2008;24:552-63.
- Liu Y, Xu L, Hennig AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Mosinger Ogilvie J, Cai SR, Parker Ponder K. Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther*. 2005;11:35-47.
- Maegawa GH, Tropak M, Buttner J, Stockley T, Kok F, Clarke JT, Mahuran DJ. Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem*. 2007;282:9150-61.

- Malm G, Gustafsson B, Berglund G, Lindström M, Naess K, Borgström B, von Döbeln U, Ringdén O. Outcome in six children with mucopolysaccharidosis type IH, Hurler syndrome, after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Acta Paediatr.* 2008;97:1108-12.
- Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2007;2:595-607.
- Mayer FQ, Baldo G, de Carvalho TG, Lagranha VL, Giugliani R, Matte U. Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artif Organs.* 2010, 34:434-9.
- Matte U, Carvalho TG, Mayer FQ, Lagranha VL, Giugliani R. Cell Microencapsulation: a Potential Tool for the Treatment of Neuronopathic Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease, in press.*
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999, 281:249-54.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53:283-318.
- Muenzer J, Fisher A. Advances in the treatment of mucopolysaccharidosis type I. *N Engl J Med.* 2004;350:1932-4.
- Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA; International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics.* 2009;123:19-29.
- Mühlemann O, Eberle AB, Stalder L, Zamudio Orozco R. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779:538-49
- Munoz-Rojas M-V, Vieira T, Costa R, Fagundes S, John A, Jardim LB, Vedolin LM, Raymundo M, Dickson PI, Kakkis E, Giugliani R. 2008. Intrathecal enzyme



- replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am J Med Genet Part A* 146A:2538–2544.
- Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within introncontaining genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci.* 1998;23:198–199.
- Nardi NB, Teixeira LAK and Silva EFA. Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002; 7:109-116
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311:622-7.
- Nelson DL. In: Lehninger, eds. *Biochemical Principles*, 4<sup>th</sup> edition, Sarvier. 2006;212.
- Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition. New York: McGraw-Hill, 2001;3421-3452.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113:823-39.
- Okumiya T, Kroos MA, Vliet LV, Takeuchi H, Van der Ploeg AT, Reuser AJ. Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II. *Mol Genet Metab.* 2007;90:49-57.
- Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Luis Pedraz J. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:207-10.
- Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, and Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 2002;23:3825-31.

- Passini, M. A., Dodge, J. C., Bu, J., Yang, W., Zhao, Q., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kaminsky, S. M., Mao, Q., Shihabuddin, L. S., Cheng, S. H., Sleat, D. E., Stewart, G. R., Davidson, B. L., Lobel, P., and Crystal, R. G. Intracranial delivery of CLN2 reduces brain pathology in a mouse model of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Neurosci.* 2006;26:1334–1342.
- Pastores GM, Arn P, Beck M, Clarke JT, Guffon N, Kaplan P, Muenzer J, Norato DY, Shapiro E, Thomas J, Viskochil D, Wraith JE. The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Genet Metab* 2007;91:37- 47.
- Perlmutter, D.H. Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr. Res.* 2002;52:832–836
- Peters C, Balthazor M, Shapiro E, King R, Kollman C, Hegland JC, Henslee-Downey J, Trigg ME, Cowan MJ, Sanders J, Bunin N, Weinstein H, Lenarsky C, Falk P, Harris R, Bowen T, Williams T, Grayson G, Warketin P, Sender L, Cool V, Crittenden M, Packman S, Kaplan P, Lockman L, Anderson J, Krivit W, Dusenbery K, Wagner J Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood.* 1996; 87:4894-4902
- Peters, C. and Steward, C. G. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:229–239.
- Piotrowska E, Jako´bkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Liberek, Maryniak A, Malinowska M, Czartoryska B, Puk E, Kloska A, Liberek T, Baranska S, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr. Ther. Res.* 2008;69:166–179.
- Platt F M, Neises GR, Dwek RA, Butters TD. Nbutyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1994;269:8362–8365.
- Ponder KP. Immunology of neonatal gene transfer. *Curr Gene Ther.* 2007;7:403-10.

- Prasad VK, Kurtzberg J. Cord blood and bone marrow transplantation in inherited metabolic diseases: scientific basis, current status and future directions. *Br J Haematol.* 2010;148:356-72.
- Rana S, Yeh YC, Rotello VM. Engineering the nanoparticle-protein interface: applications and possibilities. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14:828-34.
- Ratner BD. Biomaterials: Where we have been and where are we going. *Ann Rev Biomed. Eng.* 2004;6:41-75
- Rempel BP, Clarke LA, Withersa SG. A homology model for human  $\alpha$ -L-iduronidase: Insights into human disease *Molecular Genetics and Metabolism* 85 (2005) 28–37
- Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol. Genet. Metab.* 2007;92:115–121.
- Samanta B, Yan H, Fischer NO, Shi J, Jerry DJ, Rotello VM. Protein-passivated Fe(3)O(4) nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *J Mater Chem.* 2008;18:1204-1208.
- Sands, MS and Davidson BL. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol. Ther.* 2006;13:839–849.
- Sanders CR Nagy JK. Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000;10:438–442.
- Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, Kelly JW. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol.* 2005;12:1235-44.
- Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 26;99:15428-33.

- Schaffazick SR, Siqueira IR, Badejo AS, Jornada DS, Pohlmann AR, Netto CA, Guterres SS. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69:64-71.
- Schiffmann R, Fitzgibbon EJ, Harris C, DeVile C, Davies EH, Abel L, van Schaik IN, Benko W, Timmons M, Ries M, Vellodi A. Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann. Neurol.* 2008; 64:514–522.
- Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* 2001;413:814-21.
- Schubert D. The biological roles of heparan sulfate proteoglycans in the nervous system. *Neurobiol Aging.* 1989;10:504-6.
- Sifuentes M, Doorshow R, Hoft R, Mason G, Walot I, Diament M, Okazaki S, Huff K, Cox GF, Swiedler SJ, Kakkis ED A follow-up study of MPS I patients treated with Laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol Genetics and Metabolism,* 2007; 90:171-180.
- Silva AL, Romão L. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett.* 2009 4;583:499-505.
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *art Fibre Toxicol.* 2010;21;7:22.
- Souza MV, Krug BC, Picon P, Schwartz IVD. Medicamentos de alto custo para doenças raras no Brasil: o exemplo das doenças lisossômicas. *Ciência e Saúde Coletiva,* 2008, 883:1-11.
- Sugawara K, Saito S, Ohno K, Okuyama T, Sakuraba H. Structural study on mutant alpha-L-iduronidases: insight into mucopolysaccharidosis type I. *J Hum Genet.* 2008;53:467-74.

- Sun W, Xie C, Wang H, Hu Y. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*. 2004;25:3065–71.
- Tan ML, Choong PFM, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 2010;31:184–193.
- Thompson J, O'Connor M, Mills JA, Dahlberg AE. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *J Mol Biol*. 2002;322:273-9.
- Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11:S81-91.
- Tylki-Szymanska A, Marucha J, Jurecka A, Syczewska M, Czartoryska B. Efficacy of recombinant human alpha-L-iduronidase (Laronidase) on restricted range of motion of upper extremities in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33:151-7.
- Uludag H, Vos P and Tresco P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advac. Drug Delivery Reviews* 2000;42:29-64.
- van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Storm G, Hennink WE, Schiffelers RM, Mastrobattista E. Identification of peptide ligands for targeting to the blood-brain barrier. 1. *Pharm Res*. 2010;27:673-82.
- Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, D'Isa R, Ungaro D, Stok M, Sanvito F, Mariani E, Staszewsky L, Godi C, Russo I, Cecere F, Del Carro U, Rubinacci A, Brambilla R, Quattrini A, Di Natale P, Ponder K, Naldini L, Biffi A. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*. 2010;116:5130-9.
- Wilschanski M, Famini C, Blau C, Rivlin J, Augarten A, Avital A, Kerem B, Kerem E. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying premature stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:860–865.

- Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med.* 2003 9;349:1433-41.
- Winchester BG. Lysosomal metabolism of glycoconjugates. *Subcell Biochem.* 1996;27:191-238.
- Wolf DA, Lenander AW, Nan Z, Belur LR, Whitley CB, Gupta P, Low WC, McIvor RS. Direct gene transfer to the CNS prevents emergence of neurologic disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Neurobiol Dis.* 2011;43:123-33.
- Worgall, S., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kosofsky, B., Kekatpure, M. V., Neyzi, N., Dyke, J. P., Ballon, D., Heier, L., Greenwald, B. M., Christos, P., Mazumdar, M., Souweidane, M. M., Kaplitt, M. G., and Crystal, R. G. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum. Gene Ther.* 2008;19:463–474.
- Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomedical Materials.* 2006;1:R1–R9.
- Yang C, Feng J, Song W, Wang J, Tsai B, Zhang Y, Scaringe WA, Hill KA, Margaritis P, High KA, Sommer SS. A mouse model for nonsense mutation bypass therapy shows a dramatic multiday response to geneticin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:15394-9.
- Yih TC, Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem.* 2006;97:1184-90.
- Yu L, Huang M, Wang PG, Zeng X. Cross-linked surface-grafted glycopolymer for multivalent recognition of lectin. *Analytical Chemistry.* 2007;79:8979-86.
- Zhang HL, Wu JJ, Ren HM, Wang J, Su YR, Jiang YP. Therapeutic effect of microencapsulated porcine retinal pigmented epithelial cells transplantation on rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Bull.* 2007;23:137-44.

Zhang J, Maquat LE. Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *EMBO J.* 1997;16:826-33.

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:761-9.