UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ANGELO LUIS CARON

**Desenvolvimento de sistemas lipossomais para a
liberação da alfa-glicosidase como proposta para a terapia
da doença de Pompe**

Ribeirão Preto

2021

ANGELO LUIS CARON

Desenvolvimento de sistemas lipossomais para a liberação da alfa-glicosidase como proposta para a terapia da doença de Pompe

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/06/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Caron, Angelo Luis

Desenvolvimento de sistemas lipossomais para a liberação da alfa-glicosidase como proposta para a terapia da doença de Pompe

. Ribeirão Preto, 2021.

101 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra

1.Lipossomas. 2. Doença de Pompe. 3. Alfa-glucosidase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angelo Luis Caron

Desenvolvimento de sistemas lipossomais para a liberação da alfa-glicosidase como proposta para a terapia da doença de Pompe

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Vitória Lopes Badra Bentley pela orientação e confiança, mesmo eu nunca tendo trabalhado com nanotecnologia antes do doutorado, e por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos.

Aos meus pais, Romildo e Evete, por todo o apoio durante tanto tempo de estudos e todo o carinho durante toda a vida.

Ao meu irmão, Leonardo, por compartilhar comigo seus melhores e piores momentos, me permitindo acompanhar seu crescimento como a pessoa maravilhosa que você se tornou.

A minha maridona linda Ana Cristina por me ajudar imensamente em tudo nessa vida e encher meus dias de alegria e amor. Sem você e nossas filhotas, Amora e Luna, esses tempos teriam sido muito mais difíceis.

Aos queridos Claudia, José Mario, Ana Bea e Fê, por todo o apoio e por sempre tentarem entender o que eu fazia. Um agradecimento especial à Bia pela ajuda artística.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial a Ana, Juliana, Fabíola, Henrique e o Zé, pela convivência, amizade, toda a ajuda com meu projeto ao longo desses anos e os muitos cafés que iniciavam nossos dias, principalmente o martelão.

A todos os meus amigos queridos por sempre estarem por perto mesmo que a distância tenha sido cada vez maior. Cada encontro, mesmo que virtual, é sempre uma renovação das alegrias.

Aos funcionários da FCFRP, Eduardo Tozzatto, pela ajuda nas análises por microscopia confocal, e Fabiana pela ajuda nas análises por citometria de fluxo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e todos os seus docentes e funcionários por todo o auxílio, principalmente aos funcionários da secretaria da pós-graduação por sempre me ajudarem no que precisei. Também ao Professor Marcelo Baruffi por me permitir utilizar seu laboratório nas análises de eletroforese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

EPÍGRAFE

Não estamos perdidos.

Pelo contrário, venceremos se não tivermos desaprendido a aprender.

Rosa Luxemburgo

RESUMO

Caron, A. L. **Desenvolvimento de sistemas lipossomais para a liberação da alfa-glicosidase como proposta para a terapia da doença de Pompe**. 2021. 101f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A doença de Pompe é causada pela deficiência da enzima lisossomal α -glicosidase ácida (GAA) resultando em acúmulo de glicogênio nas células. Os principais tecidos atingidos são o cardíaco, os musculares e o nervoso. O espectro clínico compreende uma forma infantil, mais severa com alta morbidade e mortalidade, e uma tardia, com progressão mais lenta, que resulta em fraqueza muscular e insuficiência respiratória. A terapia atualmente disponível consiste na reposição enzimática com uma enzima recombinante e representou uma melhora significativa da expectativa de vida dos pacientes. Apesar disso, alguns fatores ainda limitam seus benefícios, como a baixa biodisponibilidade e absorção da enzima livre pelas células alvo, não interrompendo a progressão da doença. Dessa forma, o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos surge como uma alternativa para superar as dificuldades da aplicação da enzima livre na circulação sanguínea. Entre os sistemas disponíveis, os lipossomas representam uma tecnologia avançada de carregamento de moléculas ativas. Os lipossomas são estruturas vesiculares fosfolipídicas biocompatíveis e biodegradáveis que permitem a entrega de agentes terapêuticos para o interior das células ou compartimentos celulares. O revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), aumenta significativamente seu tempo de circulação. Ainda, ligantes específicos, como anticorpos, têm sido incorporados na superfície desses lipossomas buscando o direcionamento ativo para um local alvo. Com isso, o uso de um carreador lipossomal de longa circulação e funcionalizado com o anticorpo para o receptor de insulina humana representa uma proposta inovadora para otimizar a distribuição da enzima da GAA para os tecidos alvos, diminuindo a dose terapêutica necessária e superando as atuais barreiras para um tratamento adequado da doença de Pompe. No presente trabalho, foram padronizadas condições experimentais para obtenção de lipossomas peguados contendo a enzima GAA. Os sistemas obtidos apresentaram tamanho em torno de 135 nm com uma polidispersividade de 0,144, potencial zeta de -25,2 mV e eficiência de encapsulamento de 90% para a GAA. Os ensaios de atividade enzimática demonstraram a estabilidade da enzima durante o processo de obtenção dos lipossomas. A funcionalização da superfície dos sistemas com anticorpo para o receptor de insulina apresentou eficiência de 90%. Com isso, demonstramos que a GAA pode ser encapsulada em um sistema lipossomal peguado, com tamanho e distribuição de tamanho adequadas para aplicação endovenosa. Os ensaios de citometria de fluxo e microscopia confocal demonstraram que as formulações funcionalizadas são capazes de adentrar a célula e entregar a enzima no interior dos lisossomos com maior eficiência. Dessa forma, a futura aplicação de lipossomas direcionados para o receptor de insulina apresenta perspectivas de diminuição da dose terapêutica da GAA e a superação de importantes barreiras biológicas para o tratamento adequado da doença de Pompe.

Palavras-chave: Lipossomas; doença de Pompe; anti-receptor de insulina

ABSTRACT

Caron, A. L. **Development of a liposomal system for delivery of the acid alpha-glucosidase as a proposition for therapy of the Pompe disease.** 2021. 101f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Pompe disease is a rare autosomal recessive lysosomal storage disease caused by deficiency of the enzyme acid- α -glucosidase (GAA), resulting in glycogen accumulation in the lysosomes of cardiac muscle, skeletal muscle, and motor neurons, which ultimately results in cardiorespiratory failure. The only therapy clinically available is the enzyme replacement therapy (ERT). However, the low availability and poor uptake of the recombinant enzyme by the target cells still limits the benefits of the treatment. In this scenario the development of drug carrier systems emerges as an alternative to overcome these problems. Liposomes coated with hydrophilic polymer, such as PEG (polyethylene glycol) represents an advanced technology to deliver therapeutic agents to a target site. In the present study we developed a liposomal formulation encapsulating the GAA enzyme and functionalized with the anti-insulin receptor. Liposomes composed of DPSC, Cholesterol, DSPE-PEG and DSPE-PEG-maleimide were prepared by thin-film hydration method followed by extrusion in 100 nm polycarbonate membranes. The best parameters of lipid concentration, velocity of rotation of the flask in the evaporation and hydration phase and number of extrusion cycles were determined by a Box-Behnken design. Liposomes were characterized for size, polydispersity (PDI), zeta potential, stability, concentration and efficiency of the encapsulation of the GAA. Also, the enzyme had its activity assessed during all stages of liposome production. After preparing 15 different formulations of liposomes, we were able to establish the best parameters of liposome production. The resulting formulation showed a medium size of 135.2nm, a PDI of 0.144 and zeta potential of -25.2mV. There was no difference in size and PDI when encapsulating the enzyme. Also, we accessed the levels of activity of the enzyme during hydration and extrusion and there was no loss of activity when compared to optimal conditions. The formulations were found to be stable for at least a month when stored at 4°C and 37°C. The efficiency of encapsulation of the GAA was indirectly and directly measured by Bradford protein assay and showed an efficiency of around 90% by both methods. We demonstrated by flow cytometry that the liposomes were efficiently internalized by endothelial cells and that the pre-treatment with insulin significantly reduce uptake of anti-insulin receptor coated liposomes. Moreover, confocal microscopy image analysis demonstrated that anti-insulin receptor coated liposomes have a higher colocalization with a specific lysosomal marker when compared to plain liposomes. The use of nanotechnology is an interesting strategy to overcome the barriers of a successful ERT for lysosomal storage disorders. Here, we presented a stable pegylated liposome with characteristics suitable for an intravenous application. The efficient encapsulation of the GAA enzyme demonstrate the possible application of a liposomal system in the pursuit of an adequate treatment of Pompe disease.

Keywords: Liposome; Pompe disease; insulin receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando os diferentes tipos de lipossomas e seus compartimentos. Fármacos hidrofóbicos podem ser encapsulados na bicamada lipídica e fármacos hidrofílicos são encapsulados no interior aquoso. Lipossomas podem ser modificados com PEG para aumentar seu tempo de circulação e outras moléculas, como anticorpos, para especificar o direcionamento da vesícula.	15
Figura 2. Estratégias do presente projeto para a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) na doença de Pompe.	22
Figura 3. Reação de funcionalização dos lipossomas de longa duração com anticorpo monoclonal utilizando o reagente de Traut. Inicialmente o anticorpo é incubado com o reagente de Traut para a formação de um terminal sulfidril (A); posteriormente o anticorpo é incubado com o lipossoma contendo o grupamento maleimida para a funcionalização do lipossoma com o mab por uma ligação covalente (B).	28
Figura 4. Representação dos diferentes métodos utilizados para avaliar a eficiência de encapsulação da enzima GAA nos lipossomas. (A) na ultracentrifugação tangencial a GAA livre passa pela membrana e é recuperada no filtrado, já os lipossomas são retidos pela membrana. (B) na ultracentrifugação por gradiente de sacarose quatro soluções com diferentes concentrações de sacarose foram empilhadas nos tubos e os lipossomas são separados das enzimas livres por diferença de densidade.	33
Figura 5. Representação da delimitação das regiões de interesse (ROIs) para cada célula.	38
Figura 6. Gráfico de efeito padronizado para tamanho e PDI após análise das respostas obtidas nos experimentos de otimização.	43
Figura 7. Quantidade de proteína total avaliada nos sobrenadantes da filtração tangencial e do gradiente de sacarose para determinar a eficiência de encapsulação. ($P < 0,05$)	48
Figura 8. Eletroforese em SDS-PAGE com coloração em prata para a verificação da integridade do anti-receptor de insulina humano. Sendo anticorpo controle (A); anticorpo em solução com 2-iminotiolano (B); e anticorpo recuperado após funcionalização com os lipossomas (C).	52
Figura 9. Perfil e crescimento e viabilidade da linhagem celular endotelial Ea.hy926 durante 240 horas de cultivo.	53
Figura 10. Citotoxicidade das formulações lipossomais com e sem o anticorpo acoplado à superfície das partículas.	54
Figura 11. <i>Uptake</i> dos lipossomas pelas células endoteliais por citometria de fluxo. Porcentagem de células Ea.hy926 positivas para rodamina após 1, 2, 4 e	55

24 horas de incubação com lipossomas não funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro) (A) e lipossomas funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro-InsR) (B).

Figura 12. *Uptake* celular dos lipossomas pelas células Ea.hy926 após pré-tratamento das células com insulina recombinante humana (20 µg/mL) após 24 horas de incubação com lipossomas não funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro) e os lipossomas funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro-InsR). Os níveis de entrada dos lipossomas funcionalizados foram diminuídos pela presença da insulina no meio de cultura ($P < 0.0001$).

56

Figura 13. Esquema representando o caminho dos lipossomas funcionalizados para o interior das vesículas lisossomais após serem reconhecidos pelos receptores de insulina. O tratamento das células com insulina humana recombinante resultou na diminuição da internalização das vesículas pelas células endoteliais.

57

Figura 14. Esquema representando a formulação completa desenvolvida no presente trabalho. Após a ligação com os primeiros receptores de insulina na superfície das células, outros são atraídos para a zona de contato, onde se ligam aos demais ligantes na superfície da partícula.

59

Figura 15. Fluorescência resultante de diferentes parâmetros de tempo e concentração de LysoTracker Green para a marcação dos lisossomos das células endoteliais. CTCF (*Corrected Total Cellular Fluorescence*).

60

Figura 16. Microscopia confocal das células Ea.hy926 incubadas com lipossomas funcionalizados e não funcionalizados carregando rodamina por 4 e 24 horas. As células tiveram os núcleos corados com DAPI (azul) e os lisossomos corados com LysoTracker® Green (verde). A colocalização foi avaliada pela sobreposição da rodamina (vermelho) com os lisossomos (verde) pelo método de Costes. Barra de escala = 20 µm.

62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas quiméricas para o tratamento de DDL. Adaptado de MURO, 2010	9
Tabela 2 – Produtos baseados em lipossomas atualmente em uso clínico	17
Tabela 3 – Atividade da enzima GAA após 10 minutos de hidratação em PBS (pH 7,0) nas temperaturas de 55, 58 e 60°C em relação à temperatura controle (37° C) (P<0,05).	41
Tabela 4 – Formulações preparadas seguindo as variáveis propostas pelo modelo Box-Benhken. Os fatores avaliados foram: concentração total de lipídios (1, 5 e 10 mM) na etapa de hidratação; velocidade de rotação do frasco na etapa de formação do filme lipídico (50, 100 e 150 rpm); e o número de ciclos de extrusão (10, 13 e 16 ciclos). As respostas foram obtidas para tamanho e PDI.	42
Tabela 5 – Tamanho de partícula, PDI e potencial zeta dos lipossomas vazios e contendo a GAA produzidos após a otimização.	44
Tabela 6 – Tamanho e PDI dos lipossomas vazios e contendo a GAA obtidas após otimização nos tempos 0, 10 e 30 dias a 4° C e nos tempos 0, 15 e 30 dias a 37° C.	46
Tabela 7 – Eficiência de encapsulação das formulações lipossomais contendo 2,5 µg GAA/mL e 60 µg GAA/mL obtidas por método de medição direta.	47
Tabela 8 – Liberação da enzima GAA após 1, 2 e 3 horas em solução PBS de pH 4,9 a 37°C.	49
Tabela 9 – Tamanho de partícula, PDI e potencial zeta dos lipossomas vazios e contendo a GAA produzidos após a otimização.	51
Tabela 10 – Análise da colocalização da rodamina com os lisossomos marcados com a sonda ácida LysoTracker® Green após 4 e 24 horas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MUG	4-Metilumbeliferil-Alfa-D- glicopiranosídeo
AMD	deficiência de maltase ácida
ASM	Esfingomielinase
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHE	Barreira hematoencefálica
cDNA	DNA complementar
CFV	Capacidade de força vital
CHO	células de ovário de hamster chinês
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
CRIM	<i>Cross reactive immunological material</i>
CTCF	<i>Corrected Total Cellular Fluorescence</i>
DDL	Doença do depósito lisossomal
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPSC	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]

DSPE-PEG-mal	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida(polietilenoglicol)-2000]
EE%	Eficiência de encapsulação
EMA	<i>European Medical Association</i>
EOPD	early-onset Pompe disease
FC	Fosfatidilcolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fosfatidilglicerol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fosfatidilserina
GAA	alfa-glicosidase ácida
GAArh	alfa-glucosidase ácida recombinante humana
GDS-II	doença tipo II de armazenamento de glicogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IGF-II	Fator de crescimento II
LDLR	Receptor da lipoproteína de baixa densidade
Lipo-GAA	Lipossomas carregando a enzima alfa-glicosidase
Lipo-GAA-InsR	Lipossomas carregando a enzima alfa-glicosidase funcionalizados com o anti-receptor de insulina humana
Lipo-Ro	Lipossomas marcados com Rodamina B

Lipo-Ro-InsR	Lipossomas marcados com Rodamina B funcionalizados com o anti-receptor de insulina humana
LOPD	late-onset Pompe disease
M6PR	Receptor de manose-6-fosfato
mM	Milimolar
MOC	Coeficiente de sobreposição de Mander
MPSI	Mucopolissacaridose tipo 1
Nm	Nanômetros
PBS	Tampão salino fosfato
PCC	Coeficiente de correlação de Pearson
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PES	Polietersulfona
PI	Fosfatidilinositol
PMX	Pemetrexed
RAP	Receptor associado a proteína
RIH	Receptor de insulina humana
Ro	Octadecil-Rodamina B
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino

siRNA	RNA de interferência
SNC	Sistema nervoso central
TC6M	Teste de 6 minutos de caminhada
Td	Tempo de duplicação celular
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TER	Terapia de reposição enzimática
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
$X_{\max}$	Concentração celular máxima

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Pompe e a enzima alfa-glicosidase ácida (GAA)	2
1.2. Terapia de reposição enzimática (TRE)	3
1.3. TREs alternativas para a Doença de Pompe	9
1.4. Nanotecnologia e sistemas de liberação para proteínas terapêuticas	12
1.4.1. Lipossomas	13
1.4.2. Lipossomas para o Tratamento de doenças de depósito lisossomal (DDL)	18
1.5. Justificativa	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Material	26
3.2. Método de preparo dos lipossomas	26
3.3. Funcionalização dos lipossomas peguilados com o anticorpo para o receptor de insulina	27
3.4. Avaliação da integridade do anticorpo anti-receptor de insulina humana por SDS-PAGE	29
3.5. Características físico-químicas dos sistemas obtidos	29
3.5.1. Análise do tamanho médio e distribuição do tamanho dos lipossomas	29
3.5.2. Avaliação da eficiência de encapsulação	30
3.5.3. Determinação da atividade da alfa-glicosidase ácida	34
3.6. Ensaios de internalização dos sistemas lipossomais contendo GAA	34

3.6.1. Culturas celulares e ensaios in vitro	35
3.6.2. Ensaio de citotoxicidade	35
3.6.3. Avaliação do <i>uptake</i> celular	36
3.6.4. Avaliação da localização intracelular por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)	36
3.7. Análise estatística	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Análise da estabilidade da proteína alfa-glicosidase ácida (GAA) em temperaturas maiores que 37° C.	40
4.2. Caracterização do tamanho dos lipossomas peguilados após homogeneização com extrusor	41
4.3. Determinação da eficiência de encapsulação da GAA nos lipossomas	46
4.4. Eficiência de funcionalização do anticorpo na superfície lipossomal	50
4.5. Ensaio de citotoxicidade	52
4.6. Avaliação da internalização dos lipossomas por citometria de fluxo	54
4.7. Colocalização das nanopartículas em lisossomos marcados	59
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Pompe e a enzima alfa-glicosidase ácida (GAA)

A doença de Pompe, também conhecida como deficiência de maltase ácida (AMD) ou doença tipo II de armazenamento de glicogênio (GDS-II), é um distúrbio autossômico recessivo causado pela deficiência da enzima lisossomal α -glicosidase ácida (GAA) e consequente acúmulo de glicogênio nas células, especialmente do coração, músculos esquelético e liso e do sistema nervoso. Foi primeiramente descrita em 1932 por Johannes Cassianus Pompe em uma criança de 7 meses que apresentava fraqueza muscular severa, cardiomiopatia hipertrófica e acúmulo de glicogênio em vários tecidos. No mesmo ano, Bischoff e Putschar também descreveram a doença de maneira independente (DASOUKI *et al.*, 2014; MEENA; RABEN, 2020).

A doença de Pompe já foi documentada na maioria dos grupos étnicos com taxas de ocorrência variando desde 1:14.000 em populações africanas e afro-americanos, até 1:283.000 na Europa. Os pacientes são divididos em dois grupos principais em relação a idade de manifestação dos sintomas. A forma menos frequente (1:138:000) é chamada forma infantil (*early-onset Pompe disease*, EOPD) e é definida pelo aparecimento dos sintomas nos primeiros 12 meses de vida, entretanto, os sintomas se manifestam tipicamente nos primeiros 2 meses de vida (HAHN; SCHÄNZER, 2019). Já a forma tardia (*late-onset Pompe disease*, LOPD) é mais frequente (1:57.000) e se caracteriza pelo aparecimento dos sintomas após o primeiro ano de vida (BELLOTTI *et al.*, 2020). O diagnóstico é feito em pacientes de todas as idades, mas, de modo geral, é feito tardiamente entre os 27 e 41,1 anos (MÜLLER-FELBER *et al.*, 2007; VAN DER BEEK *et al.*, 2006; VANHERPE *et al.*, 2020). Felizmente, a crescente disponibilidade de programas de triagem neonatal para doenças lisossômicas tem permitido o diagnóstico prévio desses pacientes, aumentando as chances de sucesso do tratamento (BRAVO *et al.*, 2017; CHIEN; HWU; LEE, 2019; WASSERSTEIN *et al.*, 2019).

A forma infantil é mais severa. Os principais sintomas incluem fraqueza muscular profunda, hipotonia e cardiomiopatia hipertrófica. A maioria dos pacientes não sobrevive além do primeiro ano de vida, vindo a óbito por falência cardíaca (VAN DEN HOUT, H. M. P. *et al.*, 2003). Essa forma é chamada clássica e se caracteriza pela

completa ou quase completa ausência de atividade da GAA (DASOUKI *et al.*, 2014; HAHN; SCHÄNZER, 2019). A forma tardia é caracterizada por progressiva fraqueza muscular variavelmente associada à insuficiência respiratória. Quando sem tratamento, a força muscular e a função respiratória se agravam gerando a necessidade de cadeira de rodas e suporte respiratório na maioria dos pacientes (TOSCANO; RODOLICO; MUSUMECI, 2019). Esses pacientes apresentam baixa qualidade de vida (HAGEMANS *et al.*, 2004) com uma taxa de mortalidade acima da média populacional, sobrevivendo até 27 anos após o diagnóstico (GÜNGÖR *et al.*, 2011), além de representarem alto custo social e pessoal (KANTERS *et al.*, 2011; TOSCANO; RODOLICO; MUSUMECI, 2019).

O gene da GAA está localizado no cromossomo 17 e apresenta aproximadamente 18.3kb contendo 20 exons. O cDNA correspondente apresenta 2859 nucleotídeos e codifica uma proteína imatura de 952 aminoácidos com 7 sítios potenciais de N-glicosilação (GEEL *et al.*, 2007; TAJIMA *et al.*, 2007). No retículo endoplasmático, a enzima é glicosilada com resíduos de manose fosforilados que asseguram o transporte para o lisossomo pela via do receptor de manose-6-fosfato (DASOUKI *et al.*, 2014). No lisossomo, a enzima precursora sofre um processo proteolítico no aminoácido 122 da região amino-terminal, resultando em um intermediário de 95-kDa. O intermediário sofre uma nova clivagem nas regiões carboxi e amino-terminal resultando em uma proteína de 76-kDa, que é novamente clivada no aminoácido 204 da região amino-terminal resultando na forma final da enzima de 70-kDa (KOHLE; PUERTOLLANO; RABEN, 2018). A identidade das proteases envolvidas nesse processo ainda não é conhecida (MORELAND *et al.*, 2005).

1.2. Terapia de reposição enzimática (TRE)

A TRE foi sugerida por Christian de Duve e Roscoe Brady no ano de 1960, baseada na ideia de que as macromoléculas podem chegar aos lisossomos por vias de endocitose mediada por receptores (PLATT *et al.*, 2018). Entretanto, a primeira TRE para as DDL foi desenvolvida para a doença de Gaucher tipo I, em 1991, com a proteína purificada de placentas (MECHLER *et al.*, 2015).

Antes do surgimento da terapia de reposição enzimática, o tratamento dos pacientes era feito de maneira paliativa com suporte respiratório, fisioterapia, suporte nutricional e controle das complicações neurológicas e cardíacas. Atualmente, a TRE é a estratégia de maior sucesso no tratamento de diversas doenças de depósito lisossomal como doença de Fabry, doença de Gaucher, deficiência da lipase ácida lisossomal, as mucopolisacaridoses I, II, IVA, VI e VII e a doença de Pompe (CHEN, H. H. *et al.*, 2019).

Para a doença de Pompe, as tentativas de tratar os primeiros pacientes datam de 1967 (HUG; SCHUBERT, 1967). Entretanto, os primeiros ensaios clínicos de sucesso aconteceram no início dos anos 2000 (PORTO *et al.*, 2012) e foram feitos com a enzima alfa-glucosidase ácida recombinante humana (GAArh), derivada do leite de coelhos transgênicos e, posteriormente, produzida em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) (AMALFITANO *et al.*, 2001; ROSSI *et al.*, 2007; VAN DEN HOUT, H. *et al.*, 2000).

No ano de 2006, 8 pacientes com idade entre 3 e 15 meses foram tratados com a enzima GAArh e apresentaram redução significativa da hipertrofia ventricular esquerda, decorrente do acúmulo de glicogênio. Ainda, cinco apresentaram desenvolvimento das funções motoras e três puderam caminhar. O tratamento reduziu significativamente a taxa de mortalidade dos pacientes tratados, sendo a sobrevida média de 21,7 meses (KISHNANI, PRIYA SUNIL *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2007).

Posteriormente, 18 pacientes com idade até 6 meses foram tratados com doses entre 20 e 40 mg/kg de GAArh derivada de célula CHO. Todos os bebês sobreviveram até os 18 meses com significativa redução da hipertrofia cardíaca. Doze bebês não precisaram de ventilação mecânica e 13 tiveram desenvolvimento motor significativo, sendo que 7 conseguiram caminhar, 3 conseguiam ficar de pé e 3 se sentavam sem apoio (KISHNANI, P. S. *et al.*, 2007; KISHNANI, PRIYA S *et al.*, 2009).

Dessa forma, foi aprovada em 2006 pela FDA (Food and Drug Administration, EUA) e EMA (European Medical Association, EU) a única enzima recombinante disponível até o momento para o tratamento da doença de Pompe. Comercializada pela Sanofi Genzyme Co. (Cambridge, EUA), essa formulação produzida em células CHO, em escala de 160L, foi chamada de Myozyme. Para atender à crescente

demanda do mercado mundial, a Genzyme construiu uma nova instalação com capacidade de 2000L para a produção do Myozyme. Entretanto, a FDA não aceitou a equivalência das proteínas produzidas nas diferentes plantas. Com isso, em 2010, a Genzyme registrou uma nova formulação com o nome de Lumizyme (FDA, 2014; KOHLER; PUERTOLLANO; RABEN, 2018; RATNER, 2009). O regime de dosagem recomendado para a TER é de 20mg/kg de peso corporal administrados a cada duas semanas como infusão intravenosa. O volume total deve ser administrado durante, aproximadamente, quatro horas.

Em uma inédita revisão sistemática da literatura, Schoser e colaboradores analisaram os custos financeiros envolvidos no cuidado de pacientes com doença de Pompe (SCHOSER *et al.*, 2019). Apesar dos custos relacionados ao tratamento paliativo serem consideráveis, os custos com a TRE representam 95% do total necessário para um ano de tratamento (KANTERS *et al.*, 2014). No Reino Unido, o custo do tratamento de um adulto com Pompe difere entre \$8989 para os cuidados paliativos e \$403.490 para a TRE (WYATT *et al.*, 2012). Nos EUA os custos da TRE chegam a \$547.835 anuais. Para os pacientes da forma infantil, a despesa total estimada ao longo da vida é de \$8.873.238. Esses valores consideram a expectativa de vida de 14 anos para os pacientes da forma grave que recebem a TRE, e demonstram a importância da acessibilidade do tratamento quando comparado à expectativa de vida de apenas alguns meses dos pacientes não tratados (KANTERS *et al.*, 2014). Além disso, alguns portadores da forma infantil recebem doses maiores do que aquelas recomendadas de 20mg/kg, chegando a 40mg/kg a cada semana, o que representa um aumento dos valores aqui discutidos (VAN GELDER *et al.*, 2016).

No Brasil, onde estima-se que existam entre 1.000 a 3.500 pacientes portadores da doença de Pompe, o Myozime foi aprovado para distribuição em 2007 (PEREIRA; BERDITCHEVSKY; MARIE, 2008). Apesar disso, até 2019 os pacientes precisavam recorrer a via judicial para receber o tratamento com a GAARh. Segundo relatório da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), no Sistema Único de Saúde apenas 106 pacientes recebem tratamento com TRE para a forma infantil, sendo a forma tardia ainda critério de exclusão (“Consulta Pública avalia PCDT para doença de Pompe,” 2020).

Os custos com o Myozyme representam um grande ônus para o Governo Federal. O preço livre de impostos registrado na Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED) de um frasco de Myozyme é de R\$ 1.222,62, o que pode representar um gasto anual aproximado de R\$ 821.600,64 considerando a dose de 20 mg/kg a cada 2 semanas em um indivíduo com a forma adulta da doença (COSTA; LEMOS; GUERRA JÚNIOR, 2014).

Apesar do inegável avanço no tratamento dos pacientes da doença de Pompe, muitos ainda apresentam progressão da doença mesmo durante a TRE (SCHOSER; HILL; RABEN, 2008). No estudo que acompanhou os 18 pacientes tratados com a GAARh derivada de células CHO, a taxa de sobrevivência foi de 72% aos 36 meses e metade dos bebês passaram a depender da ventilação mecânica (KISHNANI, PRIYA S *et al.*, 2009). Ainda, um resumo sistemático da literatura, que englobou 22 publicações com média de 45,7 meses de duração e 438 pacientes da forma tardia, analisou a taxa de mortalidade, a capacidade de força vital (%CFV) e o teste de 6 minutos de caminhada (TC6M) entre pacientes tratados e não tratados. A taxa de mortalidade dos pacientes tratados com a GAARh foi 5 vezes menor e o TC6M mostrou melhora de aproximadamente 50 metros nos primeiros 20 meses. Entretanto, apesar dos pacientes tratados terem apresentado melhora de 1,4% da %CFV, esta não se manteve ao longo do tempo (SCHOSER; STEWART; *et al.*, 2017).

A análise da qualidade de vida associada à saúde dos pacientes, feita em uma revisão de 17 publicações, mostrou que, mesmo recebendo tratamento, os pacientes da doença de Pompe apresentaram menores índices de qualidade de vida do que a média populacional, mesmo após 4 anos de TRE. As principais queixas se relacionavam com desconforto respiratório, sono de baixa qualidade e dores e cansaço maiores (SCHOSER; BILDER; *et al.*, 2017). A análise dos dados disponíveis permite afirmar que a TRE claramente retarda a progressão da doença, mas ainda é limitada em se tratando de manter a melhora dos sintomas clínicos ao longo do tempo.

Diversos fatores contribuem para a limitação da TRE, entre eles: a idade de início do tratamento (CHIEN *et al.*, 2009; KISHNANI, PRIYA S *et al.*, 2009); a condição imunológica do paciente e a suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores da enzima (KISHNANI, PRIYA S *et al.*, 2010); a preferência de absorção da GAARh pelo

fígado e o direcionamento insuficiente para os músculos e outros tecidos que não estão em contato direto com a circulação sanguínea (BOADO; PARDRIDGE, 2017; LI, MINDY, 2018; RABEN *et al.*, 2003). Além disso, estudos envolvendo a TRE em outras doenças de depósito lisossomal, como a doença de Gaucher (deficiência de beta-glucocerebrosidase) e doença de Fabry (deficiência de alfa-galactosidase A) mostraram que as enzimas recombinantes podem ser relativamente instáveis quando expostas às condições adversas do trânsito até os lisossomos, como em ambientes com pH não ácido (BENJAMIN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 1996).

A principal via de internalização das enzimas lisossomais, como a GAA, é a via dos receptores de manose e manose-6-fosfato. Entretanto, esses receptores, apesar de abundantes no coração, rins e timo e intermediários no fígado e pulmão, são deficientes nas células musculares e do cérebro (FUNK *et al.*, 1992; WENK; HILLE; VON FIGURA, 1991). Dessa forma, a glicosilação inadequada da proteína recombinante e a falta dos receptores adequados nos diferentes tipos celulares resulta em baixa eficácia da TRE convencional nos principais tecidos atingidos pela doença de Pompe (MURO; SCHUCHMAN; MUZYKANTOV, 2006).

Em testes iniciais com a enzima derivada do leite de coelhos, 4 crianças com o quadro clássico da doença de Pompe foram acompanhadas por 12 meses. Os níveis normais da proteína em tecido muscular só foram detectados após administração de uma dose de 40 mg/kg por semana da enzima (VAN DEN HOUT, H. *et al.*, 2000), uma dose altíssima quando comparada com TRE para outras doenças do depósito lisossomal. O tratamento de pacientes com a doença de Fabry, por exemplo, necessita de uma dose de 1 mg/kg (FERVENZA; TORRA; WARNOCK, 2008). Além disso, após 4 anos de idade, 3 pacientes desenvolveram insuficiência respiratória severa e passaram a depender do uso de ventilação artificial (VAN DEN HOUT, J. M. P. *et al.*, 2004).

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que a TRE nos pacientes da doença de Pompe resultou em um ganho considerável na expectativa de vida dos pacientes da forma clássica, além de uma relativa melhora de alguns sintomas em pacientes da forma tardia (SCHOSER; HILL; RABEN, 2008; TOSCANO; SCHOSER, 2013; VAN DEN HOUT, H. *et al.*, 2000). Entretanto, os efeitos no tecido

muscular esquelético têm sido variados e nem sempre promissores. Além de representar aproximadamente 40% da massa corporal, a ineficiência da GAARh em atingir esse tecido, e a resistência de alguns tipos de fibras musculares à enzima recombinante, têm representado um desafio para a TRE convencional (DROST *et al.*, 2008; SCHOSER; HILL; RABEN, 2008). Ademais, o limitado sucesso alcançado com a TRE na melhora da capacidade respiratória dos pacientes levou a hipótese de que a neuropatologia causada pelo acúmulo do glicogênio em neurônios respiratórios contribui substancialmente para o avanço das insuficiências observadas em diversos pacientes da doença de Pompe (DERUISSEAU *et al.*, 2009).

Avaliando a função pulmonar em pacientes com a forma tardia, Schneider e colaboradores mostraram que, apesar da TRE estabilizar temporariamente tal função, apenas posterga a necessidade da ventilação mecânica. Interessantemente, os pesquisadores mostraram que a pressão gerada na boca nos primeiros 100 milissegundos de inspiração, uma aptidão relacionada à capacidade neuromuscular (MILIC-EMILI; WHITELAW; DERENNE, 1975), declinou em 5 dos 6 pacientes ao longo do tratamento (SCHNEIDER, I. *et al.*, 2013). Com isso, não é possível esperar um tratamento efetivo desses sintomas neuropatológicos, já que a enzima GAA não é capaz de atravessar efetivamente a barreira hematoencefálica (BHE) (DERUISSEAU *et al.*, 2009; KIKUCHI *et al.*, 1998; RABEN *et al.*, 2003).

Por fim, a presença da enzima livre na circulação ainda pode resultar no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra a enzima, acarretando complicações diversas na busca por uma terapia de sucesso. Devido a heterogeneidade dos níveis de atividade da enzima GAA em pacientes da doença de Pompe, estes podem apresentar dois tipos de condição imunológica. Os CRIM (*Cross reactive immunological material*) positivos apresentam atividade residual da enzima, enquanto os CRIM negativos apresentam completa ausência de GAA endógena (KAZI *et al.*, 2017).

Em 2010, Kishnani e colaboradores mostraram que os resultados da terapia de reposição enzimática em pacientes CRIM negativo é similar aos não tratados e pior que CRIM-positivos tratados (KISHNANI, PRIYA S *et al.*, 2010). Um ano depois, o mesmo grupo analisou a sobrevivência geral e livre de ventilação em pacientes CRIM

negativos e positivos com altos e baixos títulos de anticorpos. Os autores descobriram que os resultados clínicos no grupo CRIM positivo com alto título de anticorpo era relativamente pior que os de baixo título, e que não havia diferença entre os pacientes CRIM negativo e os com alto título CRIM positivo. Dessa forma, concluíram que, independentemente do *status* CRIM, o prognóstico dos pacientes com altos títulos de anticorpo é pobre (BANUGARIA *et al.*, 2011). Com isso o tratamento desses pacientes necessita de indução de imunotolerância previamente à infusão da proteína GAA (KAZI *et al.*, 2017).

1.3. TREs alternativas para a Doença de Pompe

O problema da efetividade de entregar a enzima recombinante lisossomal em todos os órgãos afetados têm originado importantes estratégias por vias alternativas à via do receptor de manose-6-fosfato. Uma dessas estratégias é a geração de proteínas quiméricas ou proteínas fusionadas. Essas enzimas compreendem uma porção proteica cataliticamente ativa e um peptídeo de afinidade. Diversos trabalhos avaliaram a absorção de enzimas lisossomais fusionadas com peptídeos de afinidade para variados receptores de membrana (Tabela 1).

TABELA 1 – PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PARA O TRATAMENTO DE DDL. Adaptado de MURO, 2010

Doença	Enzima	Tag	Cultura Celular	<i>in vivo</i>	Alvo	Via de endocitose
Gaucher	Glucocerebrosidase	Tat	S	N	(-) membrana	Inespecífica
Krabbe	Galactocerebrosidase	Tat	S	N	(-) membrana	Inespecífica
MPS I	α -L-Iduronidase	Anti-InsR	S	S	InsR	Clatrina
MPS I	α -L-Iduronidase	Tf	N	S	TfR	Clatrina
MPS I	α -L-Iduronidase	RAP	S	N	Família LDLR	Clatrina
MPS VII	β -Glucoronidase	IGF-II	S	S	M6PR	Clatrina
MPS VII	β -Glucoronidase	Tat	S	S	(-)membrana	Inespecífica

Fonte: adaptado de Muro 2010. MPS, mucopolissacaridose; IGF-II, fator de crescimento II semelhante à insulina; InsR, receptor de insulina; RAP, receptor associado à proteína; Tf, transferrina; TfR, receptor de transferrina; LDLR, receptor da lipoproteína de baixa densidade; M6PR, receptor de manose-6-fosfato; (-), moléculas carregadas negativamente; S, sim; N, não; N/D, não determinado

O grupo de estudos do Professor Pardridge, da Universidade da Califórnia, fusionou quatro enzimas lisossomais, hexosaminidase A (Doença de Tay-Sachs),

palmitoil transferase 1 (Doença de Batten), esfingomielinase ácida (Doença de Niemann Pick tipo A) e betagalactosidase-1 (Gangliosidose GM1), todas relacionadas com manifestações clínicas severas no SNC. As enzimas foram fusionadas às cadeias leve e pesada do anticorpo anti-receptor de insulina humana e possuíam atividade comparável às formas recombinantes disponíveis para a TRE (BOADO *et al.*, 2019). Em 2018, o grupo publicou os resultados do primeiro ensaio clínico de uma enzima fusionada com possibilidade de cruzar a BHE. No estudo de fase II, pacientes da MPSI que apresentavam severas implicações cognitivas receberam a L-iduronidase recombinante (IDUA) fusionada com um domínio IgG direcionado para o RIH (IgG-IDUA). Após um ano de tratamento, os pacientes apresentaram redução de 23% e 26% do volume (em relação ao peso corporal) do fígado e do baço, respectivamente, e melhora significativa da mobilidade da articulação do ombro. Ainda, o quociente de desenvolvimento (QD é um teste de quociente de inteligência ajustado para a idade infantil) e o volume de massa cinzenta do córtex cerebral foram estabilizados, indicando que a IgG-IDUA foi transportada para o SNC. No momento, estão em análises as funções cognitivas e somáticas por 2 anos de tratamento com a enzima fusionada (GIUGLIANI *et al.*, 2018).

No caso da doença de Pompe, a alfa-glicosidase ácida foi fusionada a um peptídeo derivado do receptor associado a proteína, o RAP. Esse peptídeo tem afinidade por vários receptores da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, presentes na membrana celular. A enzima quimérica apresentou uma maior absorção em fibroblastos isolados de pacientes, células de glioma e mioblastos de ratos em cultura (PRINCE *et al.*, 2004).

Apesar dos resultados promissores, atingir as células do sistema nervoso central permanece um desafio para a maioria dos trabalhos. A maior concentração das enzimas terapêuticas injetadas na circulação ocorre em órgãos como o fígado e o baço, pois são altamente irrigados, e a passagem das proteínas ocorre passivamente pelos espaços entre as células endoteliais (MURO, 2010). Por outro lado, as células endoteliais do SNC formam uma camada onde as junções estão seladas. Dessa forma, a reposição enzimática não apresenta resultados promissores no tratamento da deterioração neurológica associada a doença de Pompe. Uma alternativa é buscar receptores expressos nessas células endoteliais que mediem o

transporte de substâncias através da barreira hematoencefálica por via de vesículas endocíticas (PARDRIDGE, 2006; PREDESCU; VOGEL; MALIK, 2004; STEVENS *et al.*, 2000). Esse processo, chamado de transcitose, é regulado por receptores como o de manose-6-fostato, de transferrina e o de insulina, que ativam a via endocítica mediada por clatrina (PARDRIDGE, 2006).

Utilizando essa estratégia, as enzimas β -glucoronidase (deficiente na mucopolisacaridose VII), e a sulfaminase (deficiente na mucopolisacaridose IIIA) foram transportadas para o cérebro de modelos animais em um processo mediado pelo receptor de manose-6-fosfato. Entretanto, a transcitose mediada por esse receptor é ativa somente nos primeiros momentos após o nascimento. Com isso, o influxo de enzimas injetadas por via intravenosa foi eficiente apenas em ratos neonatos de dois dias e insignificante em ratos de 8 semanas (URAYAMA *et al.*, 2008).

Em contrapartida, os receptores de insulina e transferrina permanecem ativos em células endoteliais adultas (MURO, 2010). A enzima deficiente na MPS I, alfa-L-iduronidase, foi fusionada com um peptídeo derivado de um anticorpo para o receptor de insulina humana. A enzima quimérica foi capaz de atenuar em 70% o acúmulo de glicosaminoglicanos, típico da MPS I, em fibroblastos. Além disso, acumulou no cérebro de macaco Rhesus adulto, após administração por via intravenosa (BOADO *et al.*, 2008). Uma estratégia similar demonstrou a diminuição de glicosaminoglicanos no cerebelo de camundongos após a infusão *in vivo* de um plasmídeo contendo uma sequência fusionada do gene da transferrina e da alfa-L-iduronidase (OSBORN *et al.*, 2008).

A despeito dos bons resultados, o sucesso na área de proteínas quiméricas depende da estabilidade e atividade da proteína, o que se apresenta com grande variação entre diferentes enzimas lisossomais. Além disso, a enzima infundida continua livre na circulação, sujeita ao sistema fagocitário, e a constante infusão intravenosa de grandes quantidades de proteína frequentemente resulta em reações imunológicas e queda na qualidade de vida dos pacientes, especialmente aqueles com material imunológico reativo cruzado (ausência de proteína endógena GAA detectada) (KISHNANI, PRIYA S. *et al.*, 2016; LE *et al.*, 2018).

Entretanto, mesmo considerando o crescente conhecimento a respeito da biologia das doenças de depósito lisossomal e dos inegáveis benefícios conquistados com a TRE, como a redução da mortalidade dos pacientes da doença de Pompe em 90%, muitos desafios ainda precisam ser superados (GÜNGÖR *et al.*, 2011; NAGURA; HOKUGO; UEDA, 2019). Com isso, a busca por melhorar a reposta terapêutica dos tratamentos com o desenvolvimento de nanosistemas para o carregamento da enzima vem ganhando notoriedade (SCHUH; BALDO; TEIXEIRA, 2016). Muitas das limitações da TRE podem ser superadas com o uso de nanocarreadores como, por exemplo, as reações imunológicas e a biodegradação da enzima livre na circulação. Ainda, a funcionalização da superfície das nanopartículas com um agente direcionador, como os anticorpos monoclonais, pode aumentar a biodisponibilidade da enzima nos principais tecidos e órgãos afetados, como as células musculares e as células da barreira hematoencefálica, representando uma importante inovação na TRE (SALVALAIO *et al.*, 2016; TAM *et al.*, 2016).

1.4. Nanotecnologia e sistemas de liberação para proteínas terapêuticas

A necessidade de melhorar a distribuição de agentes terapêuticos e protegê-los da degradação quando na circulação resultou no desenvolvimento da nanotecnologia de biomateriais (MURO, 2010). Com isso, a utilização da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem crescido significativamente desde a descrição de lipossomas como carreadores de proteínas, já em 1960 (BANGHAM; HORNE, 1964). Desde então, diversos produtos baseados em nanotecnologia foram aprovados pela FDA para uso clínico ou testes clínicos, sendo a maioria das aplicações compostas de lipossomas e partículas carregando um fármaco (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2019; DAVIS; CHEN; SHIN, 2008; RIEHEMANN *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2006).

Os nanocarreadores apresentam importantes vantagens em comparação com os fármacos convencionais, como: aumento da atividade terapêutica ao prolongar o tempo de meia-vida, aumento da solubilidade de drogas hidrofóbicas, redução do potencial imunogênico, e possibilidade de liberação controlada do fármaco ou ativada

por estímulo. Além disso, os efeitos colaterais do fármaco e sua frequência de administração podem ser reduzidos (SHI *et al.*, 2010).

Com isso, o impacto da nanotecnologia nos métodos de liberação de fármacos permitiu a criação de novas entidades terapêuticas com melhor eficácia e disponibilidade terapêutica. Uma série de trabalhos do grupo da Professora Silvia Muro demonstrou a eficácia do carregamento de diversas enzimas, entre elas a GAA, em nanocarreadores poliméricos direcionados para a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Foram testadas as enzimas esfingomielinase (ASM), alfa-galactosidase A e a alfa-glicosidase ácida (GAA). Em todos os casos, as enzimas chegaram até os lisossomos onde foram capazes de degradar os respectivos substratos acumulados (GARNACHO *et al.*, 2017; GARNACHO; MURO, 2017; HSU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2016; MURO *et al.*, 2008; MURO; SCHUCHMAN; MUZYKANTOV, 2006; RAPPAPORT *et al.*, 2015). Em relação à GAA, foi observado aumento de três vezes na degradação do glicogênio em modelo celular para a doença de Pompe. Após administração intravenosa em camundongos, a enzima GAA estava aumentada em todos os tecidos analisados, entre os quais se destacam o aumento de 11 vezes no coração e de 6 vezes nos músculos esqueléticos e cerebral (HSU *et al.*, 2012). Em outro trabalho, Tancini e colaboradores prepararam e caracterizaram um nanossistema composto de poli (ácido lactico-co-glicólico), PLGA, encapsulando a GAARh. O sistema apresentou maior *uptake* em cultura de fibroblastos de pacientes e permaneceu estável por 7 dias (TANCINI *et al.*, 2015).

Entre os diversos novos nanossistemas, os lipossomas representam uma tecnologia avançada de carregamento de moléculas ativas, com diversas formulações em uso clínico atualmente (BELTRÁN-GRACIA *et al.*, 2019; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

1.4.1. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas vesiculares formadas a partir da hidratação de fosfolipídios, que são moléculas anfifílicas compostas por uma cabeça hidrofílica ligada por glicerol a cadeias de ácidos graxos. Em meio aquoso, essas moléculas se

auto-organizam na forma de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Dessa forma, a parte hidrofílica das moléculas fica orientada para as fases aquosa interna e externa e as caudas hidrofóbicas se orientam de maneira oposta. Essa organização estrutural permite encapsular nos lipossomas substâncias hidrofílicas, no compartimento aquoso, e hidrofóbicas, inseridas ou adsorvidas nas membranas (ALMEIDA *et al.*, 2020; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; LANDI-LIBRANDI *et al.*, 2011). Os lipossomas podem ser formados de múltiplas lamina concêntricas, com tamanho entre 500-5000 nm (multilamelares), ou por uma única camada, podendo variar entre aproximadamente 100 nm (unilamelares pequenos) ou 200-800 nm (unilamelares grandes) (Figura 1) (HAS; SUNTHAR, 2020; TORCHILIN, 2005).

Figura 1. Esquema representando os diferentes tipos de lipossomas e seus compartimentos. Fármacos hidrofóbicos podem ser encapsulados na bicamada lipídica e fármacos hidrofílicos são encapsulados no interior aquoso. Lipossomas podem ser modificados com PEG para aumentar seu tempo de circulação e outras moléculas, como anticorpos, para especificar o direcionamento da vesícula.

Fonte: do autor

Os lipossomas são compostos de fosfolipídios naturais ou sintéticos que configuram a bicamada lipídica das membranas celulares, o que confere a vantagem desses sistemas serem biocompatíveis e biodegradáveis. Entre os fosfolipídeos mais utilizados se encontram as fosfatidilcolinas (FC), fosfatidiletanolaminas (FE), fosfatidilserinas (FS) e fosfatidilgliceróis (FG) (LI, JING *et al.*, 2015). Já o colesterol é

bastante utilizado em conjunto com esses fosfolipídeos devido a sua alta hidrofobicidade (GU *et al.*, 2020). O colesterol aumenta o empacotamento da bicamada lipídica da vesícula, reduzindo a permeabilidade da membrana, resultando em lipossomas com maior estabilidade e pouco extravasamento do conteúdo após administração sistêmica (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; BRANDL, 2001; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015b; TOH; CHIU, 2013). Dada a sua estrutura vesicular, os lipossomas oferecem ainda proteção do agente encapsulado de condições externas de inativação e possibilidade de entrega desse agente para o interior da célula ou de compartimentos celulares (TORCHILIN, 2005).

A versatilidade destes sistemas desperta a atenção dos pesquisadores para sua utilização na entrega de medicamentos desde a década de 1970. O Doxil, um dos primeiros medicamentos nanotecnológicos do mercado, utiliza lipossomas no transporte do antitumoral doxorubicina (BARENHOLZ, 2012; DIMER *et al.*, 2013). Atualmente, diversas formulações que utilizam lipossomas estão em fase clínica ou em uso para o tratamento de doenças como câncer e infecções fúngicas ou virais (Tabela 2) (BULBAKE *et al.*, 2017; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015b).

TABELA 2 – PRODUTOS BASEADOS EM LIPOSSOMAS ATUALMENTE EM USO CLÍNICO

Produto (ano de aprovação)	Agente ativo	Indicação de uso	Empresa
Doxil® (1995)	Doxorrubicina	Cancer de ovário, de mama e sarcoma de Kaposi	Sequus Pharmaceuticals
DaunoXome® (1996)	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	NeXstar Pharmaceuticals
Myocet® (2000)	Doxorrubicina	Utilizado combinado com ciclofosfamida para o tratamento de câncer de mama metastizado	Elan Pharmaceuticals
Mepact® (2004)	Mifamurtida	Osteossarcoma de alto grau não metastático ressecável	Takeda Pharmaceutical
Marqibo® (2012)	Vincristina	Leucemia linfoblástica aguda	Talon Therapeutics
Onivyde™ (2015)	Irinotecano	Utilizado combinado com fluorouracil e leucovorin no tratamento de adenocarcinoma metastático do pâncreas	Merrimack Pharmaceuticals
Abelcet® (1995)	Anfotericina B	Candidíase invasiva grave	Sigma-Tau Pharmaceuticals
Ambisome® (1997)	Anfotericina B	Infecções fúngicas oportunistas e/ou endêmias	Astellas Pharma
Amphotec® (1996)	Anfotericina B	Infecções fúngicas severas	Ben Venue Laboratories.
Visudyne® (2000)	Verteporfina	Neovascularização coroidal secundária	Novartis
Exparel® (2011)	Bupivacaína	Controle de dor no pós-operatório	Pacira Pharmaceuticals
Epaxal® (1993)	Vírus inativado da hepatite A	Hepatite A	Crucell, Berna Biotech
Inflexal® V (1997)	Hemaglutinina inativada do vírus Influenza	Influenza	Crucell, Berna Biotech

Fonte: adaptado de Bulbake *et al* 2017.

A busca por melhores aplicações terapêuticas resultou em alterações na estrutura básica dos lipossomas para seu emprego como carreadores de fármacos. Dessa forma, é possível classificar os lipossomas quanto as suas características de interação com sistemas biológicos. Lipossomas convencionais são geralmente compostos de fosfolipídios, colesterol e um lipídio carregado para evitar agregação das vesículas, o que pode resultar no extravasamento do fármaco encapsulado. Apesar de serem como biomembranas, os lipossomas são rapidamente reconhecidos

pelo sistema fagocitário mononuclear ao entrarem em contato com proteínas do plasma sanguíneo, sendo removidos da circulação (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; SERCOMBE *et al.*, 2015).

Lipossomas de longa circulação são obtidos a partir do revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos, que podem ser naturais, como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol (PI), ou sintéticos, dentre os quais o polietilenoglicol (PEG) é o mais utilizado (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; TORCHILIN, 2005). Essa camada hidrofílica previne o reconhecimento e captura dos lipossomas pelo sistema fagocitário elevando significativamente seu tempo de circulação (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015b). As vantagens dos lipossomas peguizados originou diferentes formulações, principalmente para o tratamento de câncer, que podem ser encontrados em diversos ensaios clínicos e já em formulações aprovadas pela FDA e pela agência europeia (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; SERCOMBE *et al.*, 2015).

A distribuição sistêmica dos lipossomas de longa circulação, por outro lado, resulta em menor eficiência de seu direcionamento para um determinado alvo. Buscando aumentar o acúmulo do fármaco encapsulado em um local específico, produzindo uma resposta terapêutica maior e mais seletiva, moléculas alvo tem sido incorporadas na superfície lipossomal. Esses lipossomas de longa circulação funcionalizados contém ligantes específicos que podem ser peptídeos, fatores de crescimento, ligantes de receptores e, principalmente, anticorpos monoclonais (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; NISINI *et al.*, 2018; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015b; RIP *et al.*, 2014; SERCOMBE *et al.*, 2015).

1.4.2. Lipossomas para o Tratamento de doenças de depósito lisossomal (DDL)

O encapsulamento de enzimas recombinantes lisossomais em lipossomas já foi explorado anteriormente como forma de aumentar a biodisponibilidade das enzimas relacionadas às DDLs. Em um estudo de 1977, Steger e Desnick mostraram um aumento da concentração de beta-glucuronidase no fígado e rins de camundongos

após infusão da enzima encapsulada em lipossomas carregados, detectando também atividade da mesma nos pulmões e no baço (STEGGER; DESNICK, 1977). Em outro trabalho, um modelo para doenças lisossomais foi produzido no fígado de ratos com a infusão de dextrana marcada com FITC e encapsulada em lipossomas. O tratamento dos ratos com uma enzima modelo (dextranase covalentemente ligada com PEG) encapsulada em lipossomas não só foi capaz de degradar a dextrana-FITC acumulada, mas também de prevenir o acúmulo por um período (MUMTAZ; BACHHAWAT, 1994).

Apesar dos resultados promissores, esses trabalhos utilizaram lipossomas convencionais, que são facilmente reconhecidos pelo sistema fagocitário e retirados da circulação. Recentemente, novas estratégias têm sido empregadas buscando explorar as vantagens do uso de carreadores lipossomais para superar os tradicionais problemas da terapia de reposição enzimática nas DDLs (MURO, 2010).

Schneider e colaboradores investigaram o uso de um lipossoma formado por fosfatidilinositol (PI) como veículo de transporte da proteína GAARh em modelo murino para a doença de Pompe. A enzima GAA foi associada ao PI na parte externa após exposição das suas regiões hidrofóbicas em pH ácido. O sistema PI-GAA apresentou aumento de 63% na meia-vida da GAARh na circulação, diminuição modesta do *clearance* e menor resposta imunológica em comparação com a enzima livre. Entretanto, não houve melhora no perfil farmacocinético e nem aumento da eficácia da enzima (SCHNEIDER, J. L.; DINGMAN; BALU-IYER, 2018).

Neste aspecto, diversos trabalhos têm buscado o direcionamento das moléculas terapêuticas para os tecidos de interesse, bem como para organelas específicas das células como os lisossomos (ALMEIDA *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2016). Uma das estratégias mais promissoras do uso de lipossomas peguillados é a funcionalização com ligantes associados a superfície do carreador para receptores expressos na membrana das células alvo (ALMEIDA *et al.*, 2020; JØLCK *et al.*, 2011).

Thekkedath e colaboradores produziram lipossomas modificados com o ligante lisossomotrópico octadecil-rodamina B (Ro) para melhorar a entrega de uma glucocerebrosidase recombinante comercial (GlcCerase). A análise de microscopia confocal mostrou que os lipossomas se localizaram majoritariamente nos lisossomos

aumentando em até 68% o acúmulo da GlcCerase em fibroblastos modelo para a doença de Gaucher (THEKKEDATH; KOSHKARYEV; TORCHILIN, 2013).

Lipossomas funcionalizados com um peptídeo de arginina-glicina-ácido aspártico foram capazes de entregar a enzima α -galactosidase A (GLA) nos lisossomos de células endoteliais em modelo in vitro para a doença de Fabry, resultando em maior eficiência na redução do substrato acumulado em comparação com a mesma concentração da enzima livre (CABRERA *et al.*, 2016).

Apesar de, nos últimos anos, um crescente número de trabalhos ter empregado lipossomas na tentativa de melhorar as TRE para doenças de depósito lisossomal, até o momento, não encontramos exemplos de lipossomas funcionalizados aplicados na terapia da doença de Pompe.

1.5. Justificativa

Embora seja uma doença de baixa incidência, a doença de Pompe apresenta um impacto significativo na vida dos pacientes, com alta morbidade e mortalidade. Anteriormente a aprovação da enzima recombinante, a expectativa de vida dos pacientes da forma infantil limitava-se ao primeiro ou segundo ano de vida e, em muitos casos da forma tardia, o óbito ocorria na segunda ou terceira década de vida. Entretanto, apesar da melhora inegável na qualidade de vida dos pacientes, a TRE ainda apresenta limitações que resultam na progressão dos quadros clínicos da doença em muitos pacientes sob tratamento. Considerando ainda os custos relacionados à TRE, que podem chegar a 6,5 milhões de reais após 8 anos de tratamento para um único paciente da forma tardia, é imprescindível o desenvolvimento de formas mais eficazes para garantir a atividade da alfa-glicosidase ácida nos tecidos mais atingidos pela doença.

Nesse cenário, o emprego da nanotecnologia no carreamento de fármacos emergiu como uma importante estratégia para superar as limitações associadas à TRE. Nos últimos anos, diferentes nanoplataformas têm sido utilizadas para melhorar a eficácia da TRE (ABASOLO *et al.*, 2020). Entre elas, o uso de lipossomas de longa

circulação funcionalizados tem ganhado atenção por seu sucesso em diferentes aplicações clínicas (ALMEIDA *et al.*, 2020).

A funcionalização de lipossomas baseia-se, principalmente, na formação de uma ligação tio éter entre uma sequência de maleimida para a ancoragem de um anticorpo tiolado (JØLCK *et al.*, 2011). Como já mencionado anteriormente, o receptor de insulina representa um alvo interessante para o tratamento da doença de Pompe, já que está presente em todos os tecidos dos mamíferos, principalmente nos músculos esqueléticos, fígado e células do sistema nervoso (HAVRANKOVA; ROTH; BROWNSTEIN, 1978; WATANABE *et al.*, 1998). Além disso, a via de internalização dos receptores de insulina é mediada pela proteína clatrina, a mesma via dos receptores das enzimas lisossomais endógenas (CZEKAY *et al.*, 1997; MURO, 2010).

A vantagem do direcionamento para o receptor de insulina já foi demonstrada com nanocarreadores. Ulbrich e colaboradores (2011) demonstraram que nanocarreadores de albumina humana covalentemente ligados ao anti-receptor de insulina, carregando o fármaco Loperamida, foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. O estudo também mostrou que essa passagem é mediada pelo receptor de insulina, já que a pré-infusão do anticorpo livre anti-receptor de insulina inibiu a detecção da Loperamida (ULBRICH; KNOBLOCH; KREUTER, 2011).

Até o momento não foram encontrados trabalhos empregando essa tecnologia para o tratamento da doença de Pompe. Dessa forma, a estratégia de uso de lipossoma de longa circulação, funcionalizado com o anticorpo para o receptor de insulina, pode resultar em maior distribuição da enzima da GAA para os tecidos alvos, principalmente o tecido muscular e nervoso, diminuindo a dose terapêutica necessária e superando as atuais barreiras para um tratamento adequado da doença de Pompe (Figura 2).

Figura 2. Estratégias do presente projeto para a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) na doença de Pompe.

Fonte: do autor

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema de liberação baseado em lipossomas de longa circulação funcionalizados para o receptor de insulina humana contendo a enzima alfa-glicosidase ácida (GAA) como proposta para a terapia da doença de Pompe.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção e caracterização de lipossomas de longa duração funcionalizados
- Avaliação do *uptake* celular, da via de entrada e da localização intracelular do sistema lipossomal obtido

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os lipídeos DSPC (1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), colesterol, DSPE-PEG (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]) e DSPE-PEG-maleimida 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida(polietilenoglicol)-2000] foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Enzima recombinante α -glucosidase (GAA) derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, octadecil-Rodamina B (Ro), reagente de Traut (2-Iminoethiolane), meio de montagem para lâminas Fluoromount-G®, reagente de Bradford da Bio-rad, insulina recombinante humana e todos os meios e suplementos de cultura células foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O anticorpo monoclonal (29B4) imunoglobulina G (IgG) anti-receptor de insulina foi da GeneTex GTX16884 (Irvine, USA). A linhagem celular endotelial derivada de células do cordão umbilical EA.hy926, foi adquirida com o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ cod. 0345). Os tubos concentradores de centrifuga Vivaspin® 500 Polyethersulfone, MWCO 300 kDa, foram da Sartorius (Germany).

3.2. Método de preparo dos lipossomas

Para a preparação dos lipossomas foram utilizados os lipídeos, Colesterol, DSPE-PEG e DSPE-PEG-maleimida. Os lipossomas peguados foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico, descrito por Bangham em 1965, onde os lipídios são dissolvidos em solvente orgânico, que é evaporado até que se forme uma fina lâmina lipídica no fundo de um frasco. Em seguida, o filme é hidratado com um meio aquoso apropriado até formar a dispersão de lipossomas (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965).

Para a nossa formulação, os lipídios foram utilizados seguindo a proporção: DPSC (5,2 μ mol), Colesterol (4,5 μ mol), DSPE-PEG (0,3 μ mol) e DSPE-PEG-maleimida (0,015 μ mol) (HUWYLER; WU; PARDRIDGE, 1996). Os mesmos foram dissolvidos em 6 mL de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) em balão de vidro de fundo redondo de 50 mL.

O filme lipídico foi preparado por evaporação a vácuo em rotoevaporador IKA RV 05 (IKA Laboratories, Staufen, Germany) a 60°C, por 30 minutos e 110 rotações por minuto (rpm). A hidratação foi feita a 58°C em tampão salino fosfato (PBS) em pH 7,0 com a mesma velocidade de rotação da etapa anterior por 10 minutos. A temperatura utilizada na hidratação foi determinada considerando a temperatura de transição do principal lipídio estrutural (55 °C para o DSPC) e a preservação da atividade da proteína a ser encapsulada. A homogeneização das vesículas foi feita em miniextrusora com membrana de policarbonato (Nucleopore™) com tamanho de poro de 100 nm (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) na temperatura ambiente.

Como a estrutura das vesículas formadas varia conforme os parâmetros utilizados na formação e hidratação do filme lipídico e com o número de ciclos de extrusão (AKBARZADEH *et al.*, 2013; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015a), esses parâmetros de manufatura foram determinados por planejamento experimental do tipo Box-Behnken no software Minitab® Statistical Software 17. Os fatores avaliados foram: concentração total de lipídios (1, 5 e 10 mM) na etapa de hidratação; velocidade de rotação do frasco na etapa de formação do filme lipídico (50, 100 e 150 rpm); e o número de ciclos de extrusão (10, 13 e 16 ciclos). As variáveis de resposta foram “tamanho” e “índice de polidispersão” mínimos. A identificação dos termos significantes foi feita por análise de variância (ANOVA).

Para a encapsulação, tanto a enzima α -glucosidase (2,5 ou 60 μ g/mL) quanto o marcador rodamina (Ro) foram adicionados na etapa de hidratação do filme lipídico no tampão PBS.

3.3. Funcionalização dos lipossomas peguילים com o anticorpo para o receptor de insulina

A reação de funcionalização dos lipossomas foi feita com base no trabalho de (ULBRICH; KNOBLOCH; KREUTER, 2011). Para funcionalização dos lipossomas, grupos sulfidríla são adicionados ao anti-receptor de insulina após reação dos grupos amina presentes no anticorpo com 2-iminotiolano (reagente de Traut). Para isso, uma solução de 500 μ g/mL de concentrado do anticorpo foi incubado com uma solução em

PBS/EDTA (pH=7,0) de 1,14 mg/mL do reagente de Traut em uma proporção molar de 1:40 por 2 horas a 20° C no escuro sob constante agitação (550 rpm). O anticorpo foi recuperado da solução contendo reagente de Traut por centrifugação tangencial em sistema Amicon® em tubo de 2 mL com membrana de 10 kDa a 10.000 x g para a concentração e 1.000 x g para a recuperação.

A conjugação do anticorpo reduzido com o ligante maleimida (DSPE-PEG-maleimide) foi feita com incubação *overnight* a temperatura ambiente com 2µg de anticorpo para cada 50µL de solução contendo aproximadamente 2×10^{12} lipossomos/mL (Figura 3). Os anticorpos tiolados que não reagiram foram separados por filtração tangencial a 5.000 x g no sistema Vivaspin® 500 com membrana de 300 kDa e, posteriormente, concentrados no Amicon® 10 kDa. A eficiência de ligação dos anticorpos com os lipossomas é determinada pela diferença entre a quantidade de anticorpos não conjugada e a quantidade inicial incubada com os lipossomas. A concentração de anticorpos no filtrado concentrado foi determinada por ensaio proteico de Bradford, segundo informações do fabricante.

Figura 3. Reação de funcionalização dos lipossomas de longa duração com anticorpo monoclonal utilizando o reagente de Traut. Inicialmente o anticorpo é incubado com o reagente de Traut para a formação de um terminal sulfidril (A); posteriormente o anticorpo é incubado com o lipossoma contendo o grupamento maleimida para a funcionalização do lipossoma com o mab por uma ligação covalente (B).

Fonte: do autor

3.4. Avaliação da integridade do anticorpo anti-receptor de insulina humana por SDS-PAGE

A integridade dos anticorpos foi avaliada após a reação de funcionalização com os lipossomas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o protocolo do fabricante Bio-Rad e coloração do gel com prata. Foram avaliadas uma amostra de Mab controle, uma amostra de Mab incubada com o reagente de Traut e uma amostra de Mab não funcionalizado recuperado após o processo de funcionalização dos lipossomas. As amostras foram incubadas com o agente redutor 2-mercapto-etanol por 10 minutos a 60°C para desnaturação e posteriormente centrifugadas a 10.000 x g por 2 minutos. A eletroforese ocorreu a 300 V e 20 mA por 45 minutos.

3.5. Características físico-químicas dos sistemas obtidos

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao tamanho, distribuição de tamanho (polidispersão), carga da superfície das partículas (potencial zeta, ζ), morfologia, concentração total, eficiência de encapsulação da proteína de interesse e de funcionalização com o anticorpo e perfil de liberação do conteúdo encapsulado em ambiente ácido.

3.5.1. Análise do tamanho médio e distribuição do tamanho dos lipossomas

A medida do tamanho médio e índice de polidispersão (PDI) dos lipossomas foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic light scattering*, DLS) no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). O princípio do DLS se baseia na análise do espalhamento de uma luz incidente resultante do movimento Browniano das partículas dispersas em uma solução aquosa. Assim, o diâmetro hidrodinâmico da partícula é deduzido pelas flutuações de intensidade da luz espalhada pelo uso da equação de Stokes-Einstein.

O equipamento utiliza um laser de HeNe operando a 4 mW com ângulo de detecção de 173° em comprimento de onda de 633 nm. As amostras foram diluídas em água ultrapura Milli Q, 100 e 50 vezes, e colocadas em cubeta de 1 cm de caminho

óptico para leitura a 25°C. Os resultados utilizados foram os de intensidade, entretanto, todos foram analisados.

Para a análise de estabilidade dos lipossomas, os parâmetros de tamanho e PDI foram avaliados por até trinta dias em lipossomas mantidos a 4° e 37°.

A carga superficial dos lipossomas foi determinada pelo potencial zeta, que é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas dispersas. Essa mobilidade eletroforética é observada quando a dispersão é submetida a um campo elétrico e, com isso, as partículas em suspensão passam a se mover com uma velocidade relacionada ao seu potencial zeta.

As partículas dispersas em PBS (pH 7) foram diluídas em água ultrapura e submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). A mobilidade eletroforética observada é convertida em potencial zeta através da equação de Helmholtz-Smoluchowski, feita pelo software já presente no equipamento.

$$\zeta = \frac{4\pi\eta v}{\epsilon_r \epsilon_0}$$

Onde ζ é o potencial zeta (mV); η a viscosidade do meio de dispersão; v a mobilidade eletroforética ($\mu\text{ms}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$); ϵ_r a constante dielétrica e ϵ_0 a permissividade do ar no vácuo ($8,854 \times 10^{-12} \text{C}^2 \text{J}^{-1} \text{m}^{-1}$).

Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) foi realizada com o equipamento Nanosight NS300. A formulação foi diluída 1000x em água ultrapurificada e analisada para a determinação do tamanho dos lipossomas e a concentração de partículas na solução.

3.5.2. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%)

A determinação da quantidade de GAA encapsulada pelos lipossomas foi feita por método indireto e direto. A quantidade de proteína total foi avaliada pelo método de Bradford.

Ao final da preparação dos lipossomas contendo a GAA encapsulada, a enzima GAA livre é separada da solução por ultracentrifugação tangencial a 5.000 x g por 10 minutos em microtubos com membrana de polietersulfona (PES) de 300 kDa. Dessa forma, a GAA livre passa no filtrado e os lipossomas contendo GAA encapsulada ficam retidos na membrana (Figura 4A).

Para a medição por método direto, os lipossomas contendo GAA foram rompidos com metanol na proporção 1:3 (v/v) e a solução foi ultracentrifugada em microtubos Amicon® com membrana de celulose regenerada de 10 kDa de modo a concentrar a amostra e lavar o metanol com PBS (pH 7). O cálculo da EE% foi obtido a partir da equação:

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa total de GAA na fração de lipossoma}(\mu g)}{\text{Massa total de GAA inicial}(\mu g)} \times 100$$

Para a medição por método indireto, o filtrado contendo a GAA livre foi concentrado no mesmo sistema Amicon® de 10 kDa e a EE% foi determinada segundo a equação:

$$EE(\%) = \frac{GAA_{total} - GAA_{livre}}{GAA_{total}} \times 100$$

Em cada ensaio foram analisados os sobrenadantes da formulação preparada com a GAA na etapa de hidratação, uma solução contendo as mesmas quantidades de lipossoma e GAA livres e uma solução com apenas com a GAA livre.

A caracterização foi complementada com análise por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, que permitiu verificar de modo indireto a EE% e avaliar a possível presença da GAA adsorvida na membrana externa dos lipossomas (LA BAUVE *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-LÓPEZ; FERNÁNDEZ-ROMERO; GÓMEZ-HENS, 2009). Para isso, preparamos soluções contendo 40, 20, 15 e 5% de sacarose em PBS (pH = 7). Em tubos de policarbonato de 16 x 76 mm essas soluções foram adicionadas, a partir da mais densa até a menos densa, até um volume final de 5 mL da seguinte forma: 715 µL de solução 40% de sacarose, 950 µL da solução 20%, 2,85 mL de solução 15% e 480 µL de solução 5% para completar o gradiente. As amostras a serem analisadas foram adicionadas na solução 20% de sacarose (Figura 4B). Foram

avaliadas amostras contendo GAA livre, GAA livre e lipossomas vazios e, por fim, a amostra contendo a solução resultante da preparação dos lipossomas com a GAA encapsulada e a GAA livre não-encapsulada.

A ultracentrifugação foi feita em centrífuga Beckman Coulter ProteomeLab XL-I Ultracentrifuge a $27.000 \times g$ por 3 horas. A presença da proteína foi avaliada em todas as camadas do gradiente.

Figura 4. Representação dos diferentes métodos utilizados para avaliar a eficiência de encapsulação da enzima GAA nos lipossomas. (A) na ultracentrifugação tangencial a GAA livre passa pela membrana e é recuperada no filtrado, já os lipossomas são retidos pela membrana. (B) na ultracentrifugação por gradiente de sacarose quatro soluções com diferentes concentrações de sacarose foram empilhadas nos tubos e os lipossomas foram separados das enzimas livres por diferença de densidade.

Fonte: do autor

3.5.3. Determinação da atividade da alfa-glicosidase

No presente trabalho, utilizamos a GAA neutra recombinante produzida em *Saccharomyces cerevisiae*. A atividade da GAA foi determinada por reação fluorogênica usando o substrato 4-metilumbeliferil-alfa-D- glicopiranosídeo (4-MUG). Em contato com a GAA o 4-MUG é reduzido a 4-metilumbeliferona. O substrato foi preparado na concentração final de 1,5 mM em tampão 0,1 M de ácido cítrico/0,20 M de PBS com pH 6,8 por conta do caráter neutro da enzima GAA utilizada. A curva padrão foi preparada com uma solução 100 mM da 4-metilumbeliferona em PBS (pH=6,8). A atividade de referência da enzima foi utilizada como sendo a atividade da quantidade de enzima utilizada no ensaio na sua temperatura ótima de reação (37°C).

A reação foi feita em triplicata em placas pretas de 96 poços a 37°C. Inicialmente, as amostras a serem mensuradas foram colocadas na placa até um volume final de 50 µL por poço. Em seguida foram adicionados 100 µL do substrato. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de tampão 0,4 M glicina-NaOH, pH 10,4. A fluorescência foi lida no leitor de placas Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc) com excitação de 360 nm e emissão de 450 nm.

3.6. Ensaio de internalização dos sistemas lipossomais contendo GAA

As células endoteliais representam a primeira barreira encontrada pelas enzimas recombinantes na circulação, impactando diretamente o acúmulo da proteína nos tecidos. Dessa forma, os estudos de internalização dos lipossomas obtidos foram realizados *in vitro* em cultura de células Ea.hy926 (BCRJ, COD 0345), derivadas de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano. Foi possível avaliar a citotoxicidade dos lipossomas, a eficiência de internalização dos lipossomas, bem como sua localização intracelular.

3.6.1. Culturas celulares e ensaios in vitro

A caracterização cinética das células foi realizada levando em consideração a concentração celular máxima ($X_{\max}$) acompanhada pela viabilidade celular e pelo tempo de duplicação celular (T_d), definido como o tempo necessário para duplicar o número de células presentes na cultura. O T_d foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$T_d = \frac{tx \log 2}{\log N/N_0}$$

onde t é o tempo de cultivo, N é o número de células final e N_0 é o número de células inicial da fase de crescimento exponencial.

O cultivo das células após descongelamento e para expansão inicial e manutenção foi realizado em frascos de 75 cm² (Greiner Bio-One) com 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagle's Medium* – SIGMA cellculture™) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (*Hyclone*). O SFB utilizado foi inativado por 45 minutos a 56°C. As células foram mantidas a 37°C, em ambiente com 80% de humidade e 5 % de CO₂ em incubadora.

3.6.2. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos lipossomas com e sem o anticorpo funcionalizado foi avaliada pela viabilidade celular obtida após 24 horas de incubação. As células Ea.hy926 foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 10⁴ células/poço e incubadas com concentrações de lipossomas variando de 5x10⁶ a 1x10¹⁰ partículas/mL. Sendo controle positivo células não tratadas e o controle negativo células tratadas com 30% (v/v) de DMSO. A viabilidade celular foi investigada pelo método da resazurina (Sigma-Aldrich Co., EUA), ensaio que mede a redução química do corante resazurina em decorrência da atividade metabólica celular. A leitura da placa foi realizada no aparelho BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) nas condições de excitação, 530 nm com abertura da fenda em 25 nm (forma reduzida);

emissão, 590 nm com abertura da fenda em 35 nm (forma oxidada). O experimento foi realizado em oito repetições ($n = 8$).

3.6.3. Avaliação do *uptake* celular

As análises de citometria de fluxo, para avaliar a absorção dos lipossomas pelas células endoteliais, foram realizadas com lipossomas carregando a rodamina como sonda fluorescente. Foram testadas as formulações funcionalizadas com o anti-receptor de insulina (Lipo-Ro-InsR) sem o anticorpo funcionalizado (Lipo-Ro). As células EA.hy926 foram semeadas em placas de 12 poços, 5×10^4 células/poço. Antes do tratamento, as células foram lavadas com PBS e depois incubadas com 2×10^8 partículas de lipossomas simples e funcionalizados durante 1, 2, 4 e 24 horas. Para demonstrar que a internalização dos Lipo-Ro-InsR foi mediada pelo receptor de insulina, foi adicionado meio D-MEM contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de insulina humana recombinante 30 minutos antes da incubação de 24 horas com ambas as formulações lipossomais.

Após cada procedimento, as células foram coletadas em tubos cônicos (BD, Biosciences), lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 500 μL de PBS frio e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, Biosciences). Foram consideradas na análise apenas as células viáveis com base na coloração com iodeto de propídio, que é um marcador que se intercala com o DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Os resultados foram exibidos como porcentagem de células viáveis positivas para a sonda rodamina.

3.6.4. Avaliação da localização intracelular por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

A avaliação da localização dos lipossomas marcados com rodamina no interior das células foi feita por microscopia confocal. As células Ea.hy926 foram semeadas em lamínulas de vidro em placas de 12 poços, 5×10^4 células/poço, e incubadas com lipossomas como descrito acima por 4 e 24 horas. As células foram então lavadas

com PBS e receberam meio de cultura fresco contendo 75 mM de LysoTracker® *green* por mais uma hora. O LysoTracker® é uma sonda fluorescente verde com alta afinidade por organelas ácidas, marcando, portanto, os endossomos/lisossomos. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e então fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4) durante 15 min a 4°C. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (0,3 µg/mL) e as lâminas montadas em lâminas de vidro com Fluoromount-G® e seladas com esmalte de unha transparente. As imagens foram obtidas com CLSM (Microscópio Confocal LEICA – TCS SP2; software: LAS-AF) com objetiva de imersão de 63 vezes e $\lambda = 405$ nm para DAPI; $\lambda = 511$ para LysoTracker® *green* e $\lambda = 568$ para rodamina B. Para a determinação dos melhores parâmetros de utilização da sonda LysoTracker® *green*, as imagens foram analisadas quanto a intensidade de fluorescência para cada célula. De modo a eliminar as interferências do ruído de fundo resultante da presença de marcadores livres na solução, os resultados foram apresentados como fluorescência celular total corrigida (CTCF, *Corrected Total Cellular Fluorescence*) segundo a fórmula:

$$CTCF = (\text{Área da célula} \times \text{média de fluorescência da célula}) \\ - (\text{Área da célula} \times \text{média de fluorescência das regiões sem células})$$

Para verificar a colocalização dos lipossomas e lisossomas marcados, o coeficiente de correlação de Pearson (PCC) e o coeficiente de sobreposição de Mander (MOC) foram calculados em regiões de interesse (ROI, *regions of interest*) delimitadas para cada célula individualmente (Figura 5), para evitar ruído de fundo. Foram analisadas pelo menos 30 ROIs. Todas as análises foram feitas com o software ImageJ 1.42 (NIH).

Figura 5. Representação da delimitação das regiões de interesse (ROIs) para cada célula

Fonte: do autor

3.7. Análise estatística

Os resultados (diagramas e gráficos) foram trabalhados conforme as características de cada metodologia. Para a análise estatística foram empregados testes t de *student* ou análise de variância para um fator (ANOVA) combinada com pós teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism® (San Diego, USA) com intervalo de confiança de 95%. Os experimentos foram feitos no mínimo em triplicata e os resultados dispostos como média e desvio padrão quando aplicável. Os experimentos de planejamento fatorial no modelo Box-Behnken foram feitos no *software* Minitab 17 statistical e os demais foram feitos no *software* Graphpad Prism6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da estabilidade da proteína alfa-glicosidase ácida (GAA) em temperaturas maiores que 37° C.

As temperaturas utilizadas na preparação de vesículas lipossomais podem representar uma limitação na utilização desses sistemas no carregamento de proteínas complexas. A encapsulação da GAA pelos lipossomas é feita na etapa de hidratação do filme lipídico em tampão fosfato (PBS), que deve ocorrer acima da maior temperatura de transição dos lipídeos utilizados (CHEN, W. *et al.*, 2018). Para avaliar a estabilidade da GAA nestas condições, a enzima foi submetida a três temperaturas: 55°C (temperatura mínima do processo), 58°C (temperatura média considerando a precisão do banho de água) e 60°C. Quando comparada ao controle a 37°C, temperatura ótima de atividade da enzima, apenas a atividade a 60°C provocou queda significativa de atividade. As atividades em 55 e 58°C não apresentaram diferença em relação a atividade a 37°C (Tabela 2).

Keneth e colaboradores (2013) demonstraram que, mesmo quando submetida a temperaturas de até 60°C, a enzima GAA manteve sua estabilidade térmica. Apesar desse resultado diferir do encontrado no presente estudo, a temperatura controlada do banho na etapa de hidratação do filme lipídico se mantém a, no máximo, 58°C, preservando a atividade da enzima. Além disso, Keneth e colaboradores utilizaram a enzima comercial Myozyme®, produzida em cultura de células CHO, enquanto no presente trabalho foi utilizada a enzima recombinante neutra produzida em *S. cerevisiae*. Diversos trabalhos já demonstraram que enzimas α -glicosidases de diferentes origens, como de células de arroz ou outros fungos como *Aspergillus niger*, apresentam estabilidades térmicas diferentes, em parte devido a diferenças nas modificações pós-traducionais (DEL MORAL; BARRADAS-DERMITZ; AGUILAR-USCANGA, 2018; ROIG-ZAMBONI *et al.*, 2017). Ainda assim, a enzima GAA é uma candidata potencial para ser utilizada na produção dos carreadores lipossomais por se manter estável na temperatura utilizada na etapa de hidratação do filme lipídico

Tabela 3 – Atividade da enzima GAA após 10 minutos de hidratação em PBS (pH 7,0) nas temperaturas de 55, 58 e 60°C em relação à temperatura controle (37° C) (P<0,05).

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>nmol 4-MU/min</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Atividade em relação ao controle</i>
37	0,088	0,002	100%
55	0,114	0,021	130%
58	0,069	0,007	78%
60	0,051	0,005	58%

Ensaio de fluorescência com o substrato 4-metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo e concentração de 0,25 μ g de GAA por poço em placa de 96 poços.

4.2. Caracterização do tamanho dos lipossomas peguados após homogeneização com extrusor

A escolha dos lipídeos que foram utilizados, bem como sua proporção na produção das vesículas lipossomais, foi feita com base no trabalho de Huwyler e colaboradores, que buscaram demonstrar a aplicabilidade de imunolipossomas no transporte de um quimioterápico através da barreira hematoencefálica de camundongos (HUWYLER; WU; PARDRIDGE, 1996), bem como a não toxicidade dos mesmos (LI, MINGYUAN *et al.*, 2019). Entretanto, o desenvolvimento de uma formulação requer atenção com fatores como as características físico-químicas e as quantidades dos materiais utilizados e os parâmetros escolhidos em cada etapa de produção (RANE; PRABHAKAR, 2013). Buscando minimizar os gastos de material e o número de experimentos necessários, foi realizado um planejamento fatorial no modelo Box-Behnken para otimizar os parâmetros de produção dos lipossomas com o objetivo de obter como resposta valores mínimos de tamanho e PDI.

Para as análises, foram escolhidas três variáveis do processo de produção dos lipossomas: a concentração total de lipídios utilizada na etapa de hidratação; a velocidade de rotação do frasco no rotoevaporador, durante a etapa de formação do filme; e o número de ciclos de extrusão pela membrana de polycarbonato da miniextrusora, na etapa de homogeneização da população de lipossomas.

Cada uma das variáveis foi fixada em três valores: a concentração total de lipídios, em 1, 5 e 10mM; a velocidade de rotação do frasco, em 50, 100 e 150 rpm; e o número de ciclos de extrusão, em 10, 13 e 16 ciclos.

Foram preparadas 15 formulações para análise no Minitab®. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos (resposta) para cada experimento. Os resultados foram utilizados no programa estatístico para determinar o efeito padronizado das variáveis independentes e avaliar sua influência no desenvolvimento dos carreadores lipossomais.

Tabela 4 – Formulações preparadas seguindo as variáveis propostas pelo modelo Box-Benhken. Os fatores avaliados foram: concentração total de lipídios (1, 5 e 10 mM) na etapa de hidratação; velocidade de rotação do frasco na etapa de formação do filme lipídico (50, 100 e 150 rpm); e o número de ciclos de extrusão (10, 13 e 16 ciclos). As respostas foram obtidas para tamanho e PDI.

<i>Variáveis</i>			<i>Resposta</i>	
<i>Concentração de lipídeos (mM)</i>	<i>Velocidade de rotação (rpm)</i>	<i>Ciclos</i>	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>PDI</i>
1	50	13	155,5	0,170
5	100	13	128,1	0,101
10	100	10	117,5	0,107
5	100	13	128,1	0,101
10	100	16	117,4	0,147
10	50	13	163,0	0,194
5	150	16	147,1	0,078
5	50	16	142,2	0,178
5	50	10	164,0	0,262
5	150	10	153,0	0,120
5	100	13	128,1	0,101
1	150	13	144,0	0,091
10	150	13	161,1	0,141
1	100	16	125,1	0,121
1	100	10	132,2	0,110

O efeito das variáveis independentes em relação a cada uma das respostas pode ser observado pelos gráficos de efeito padronizado (Figura 6), onde a linha vertical representa o valor p de 0,05. Como visto, apenas a influência da velocidade

de rotação do frasco é considerada significativa para ambas as variáveis de resposta, tamanho e PDI.

Figura 6. Gráfico de efeito padronizado para tamanho e PDI após análise das respostas obtidas nos experimentos de otimização. Termos: A, concentração; B, rotação; C, ciclos.

Fonte: do autor

A partir das análises de resposta, foi proposto um modelo de predição para uma formulação otimizada de lipossoma. Os valores otimizados para a concentração de lipídios, velocidade de rotação do frasco e o número de ciclos de extrusão foram 1 mM, 109,596 rpm (arredondado para 110 rpm) e 16 ciclos, respectivamente. Nestas

condições, foi possível produzir tanto lipossomas vazios quanto lipossomas contendo a proteína GAA encapsulada, com tamanhos médios de 135 nm e 140 nm como visto na tabela 4. O perfil de distribuição dos lipossomas se apresentou como monomodal com PDI de 0,144 para os lipossomas vazios e 0,180 e 0,153 para os lipossomas carregando 2.5 µg/mL e 60 µg/mL da enzima GAA, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 5 – Tamanho de partícula, PDI e potencial zeta dos lipossomas vazios e contendo a GAA produzidos após a otimização.

Solução	Concentração Lipídeos (mM)	Rotação (rpm)	Ciclos	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
Predição	1	110	16	117,5	0,086	-----
Lipo vazio	1	110	16	135,0	0,144	-26,8
Lipo 2,5 µg GAA/mL	1	110	16	135,0	0,180	-25,2
Lipo 60 µg GAA/mL	1	110	16	140,0	0,153	-25,5

Em relação as vesículas vazias, a análise de rastreamento de partículas permitiu determinar a concentração de $1,95 \times 10^{12}$ partículas/mL com tamanho estimado em 155,0 nm. Já em relação as vesículas contendo GAA, determinou-se a concentração de $1,66 \times 10^{12}$ partículas/mL, com tamanho estimado em 147,6 nm, confirmando os resultados encontrados por espalhamento de luz dinâmico (FILIPE; HAWES; JISKOOT, 2010).

A eficiência da utilização de sistemas lipossomais para a infusão intravenosa é dependente do tamanho do sistema utilizado. Partículas maiores que 200 nm acabam retidas pelo sistema imune ou acumulam no fígado e baço (ADISESHIAH; HALL; MCNEIL, 2010). Dessa forma, os sistemas obtidos, com tamanho médio de até 140 nm, são viáveis para a aplicação intravenosa e apresentou valores de PDI que representam uma população pouco polidispersa (DANAEL *et al.*, 2018). Além disso, a utilização do colesterol aumenta o empacotamento da bicamada lipídica reduzindo a captação dos lipossomas pelo sistema fagocitário (ORÄDD; LINDBLOM; WESTERMAN, 2002).

Outros trabalhos já demonstraram que nanocarreadores com tamanho abaixo dos 200 nm, contendo a GAA, são capazes de serem endocitados em modelo *in vitro* e serem eficazes na degradação do glicogênio acumulado no endossomo. Hsu e colaboradores (2012) acoplaram a enzima GAA em nanopartículas poliméricas de poliestireno de 180 nm e demonstraram que esse sistema foi capaz de chegar até os lisossomos de células do cordão umbilical humano, degradando o glicogênio acumulado no local com eficiência três vezes maior que a GAA livre. A análise da distribuição *in vivo* em camundongos mostrou ainda que o sistema pode ser encontrado nos pulmões, fígado, baço, nos músculos e no cérebro (HSU *et al.*, 2012). Já Schneider e colaboradores (2018), promoveram a associação da enzima GAA à superfície de lipossomas contendo fosfatidilinositol e demonstraram a diminuição do acúmulo de glicogênio em tecidos do coração e do músculo tríceps de camundongos com a doença de Pompe.

A estabilidade dos lipossomas foi analisada após 10 e 30 dias a 4° C, e após 15 e 30 dias a 37° C (Tabela 5). Nesse período não houve tendência de aumento dos parâmetros de tamanho e PDI, demonstrando que as formulações permanecem estáveis. Esse resultado está relacionado com a presença do PEG que reveste a superfície dos lipossomas proporcionando estabilidade estérica e prevenindo a agregação das nanopartículas (NAG; AWASTHI, 2013). O revestimento de nanocarreadores com PEG é amplamente utilizado para minimizar as interações hidrofóbica e eletrostática entre as partículas e as proteínas circulantes no plasma, minimizando a retirada dessas nanopartículas da circulação pelos macrófagos. Além disso, nanopartículas de carga negativa revestidas com PEG apresentam menor citotoxicidade e efeito hemolítico quando comparadas com nanopartículas positivamente carregadas (XIAO *et al.*, 2011).

Tabela 6 – Tamanho e PDI dos lipossomas vazios e contendo a GAA obtidas após otimização nos tempos 0, 10 e 30 dias a 4° C e nos tempos 0, 15 e 30 dias a 37° C.

		Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI
Dias		0		10		30	
4° C	Vazio	145,5	0,187	152,8	0,208	139,0	0,164
	Lipo-GAA (2,5 µg/mL)	148,3	0,183	134,8	0,152	146,0	0,185
Dias		0		15		30	
37° C	Vazio	135,0	0,144	140,0	0,166	139,0	0,149
	Lipo-GAA (2,5 µg/mL)	135,0	0,18	137,0	0,144	145,0	0,169

4.3. Determinação da eficiência de encapsulação da GAA nos lipossomas

A quantidade de GAA encapsulado foi determinada por medida indireta e direta pelo método de Bradford e filtração de fluxo tangencial. Foram desenvolvidas duas formulações lipossomais contendo diferentes concentrações da proteína GAA. A primeira, com 2,5 µg de proteína/mL, visando a análise da atividade das partículas *in vitro* em modelo celular (HSU *et al.*, 2012); e a segunda, com 60 µg/mL de GAA, visando uma futura aplicação da formulação em estudos *in vivo* em camundongos.

Devido ao seu tamanho, os lipossomas (vazios ou carregados com GAA) não atravessam a membrana do sistema de filtração, já a GAA livre é eluída e posteriormente concentrada. Para o ensaio com método direto, rompemos os lipossomas em solução de metanol (3:1). Para a formulação com 2,5 µg/mL de proteína a EE% foi de 90%. Já para a formulação com 60 µg/mL de GAA a EE% foi de 85,55% (Tabela 6).

Tabela 7 – Eficiência de encapsulação das formulações lipossomais contendo 2,5 µg GAA/mL e 60 µg GAA/mL obtidas por método de medição direta.

Formulação	EE %
Lipo-GAA (2,5 µg/mL)	90,0
Lipo-GAA (60 µg/mL)	85,5

A eficiência de encapsulação da enzima GAA nos lipossomas determinada por método indireto foi feita com duas abordagens: filtração tangencial e ultracentrifugação por gradiente de densidade de sacarose. Nos ensaios foram analisadas amostras contendo GAA livre, mistura de GAA e lipossomas vazios e GAA encapsulada nos lipossomas. Em todas as amostras a concentração da enzima foi mantida em 2,5 µg/mL.

Para a centrifugação tangencial, cada amostra foi preparada para conter 0,25 µg totais de GAA. Após a centrifugação, não houve diferença entre a quantidade de GAA nas amostras de GAA livre e da mistura de GAA e lipossomas vazios, totalizando 0,23 (DP= 0,02) e 0,26 (DP = 0,08) µg totais, respectivamente. Entretanto, as amostras de lipossomas contendo GAA encapsulado, apresentaram apenas 0,022 (DP = 0,02) µg de GAA no eluido, caracterizando uma eficiência de encapsulação de 90% (Figura 7).

O uso de um segundo método indireto buscava complementar a caracterização das formulações obtidas e avaliar a possível presença da GAA adsorvida na membrana externa dos lipossomas. No estudo de La Bauve e colaboradores (2016), um método foi desenvolvido usando ultracentrifugação com soluções com diferentes concentrações de sacarose para medir a energia necessária para liberar uma proteína fortemente ligada a uma membrana celular (LA BAUVE *et al.*, 2016).

No método de gradiente de densidade de sacarose, foram usadas soluções de PBS (pH=7) contendo concentrações de sacarose de 40, 20, 15 e 5%. Como o volume final da coluna de gradiente era de aproximadamente 5 mL, a concentração da enzima GAA foi de 12,5 µg totais. As amostras foram adicionadas na posição de 20% de sacarose.

Após o período de ultracentrifugação, os lipossomas migraram para os gradientes de 5 e 15%, como demonstrado na literatura (LA BAUVE *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-LÓPEZ; FERNÁNDEZ-ROMERO; GÓMEZ-HENS, 2009) . Nas amostras de GAA livre, 94% da proteína foi detectada nos gradientes de 20 e 40% de sacarose. Já nas amostras contendo a mistura de GAA + lipossomas vazios, a GAA foi encontrada em todas as camadas, com 47% da GAA nas camadas de 20 e 40% de sacarose. A presença da GAA nas demais camadas de menor densidade (5 e 15% de sacarose), para onde os lipossomas migraram, pode estar relacionada com a possível associação (não encapsulação) da enzima com a camada externa das vesículas lipossomais, sendo arrastadas durante a centrifugação (LA BAUVE *et al.*, 2016; SCHNEIDER, J. L.; DINGMAN; BALU-IYER, 2018). Ainda assim, o total de proteína foi de 12,3 µg totais, não sendo encontrada diferença entre os valores. As amostras da formulação contendo GAA encapsulada em lipossomas apresentaram apenas 2 µg totais de GAA livre (presente nas camadas de maior densidade, 20 e 40% de sacarose), caracterizando uma eficiência de 87% de encapsulação. A Figura 7 apresenta os resultados pelos dois métodos de avaliação. Dessa forma, demonstramos uma alta eficiência de encapsulação, determinada por dois métodos indiretos, a filtração tangencial (90% de encapsulação) e a ultracentrifugação por gradiente de densidade de sacarose (87% de encapsulação), que corroboram os resultados obtidos pelo método direto.

Figura 7. Quantidade de proteína total avaliada nos sobrenadantes da filtração tangencial e do gradiente de sacarose para determinar a eficiência de encapsulação. ($P < 0,05$)

De maneira geral, uma formulação lipossomal de sucesso deve manter uma concentração desejada do fármaco encapsulada até o seu tecido alvo. Um estudo de fase II conduzido por Kim e colaboradores (2001), com pacientes em estágio avançado de câncer de pulmão, foi encerrado já que os lipossomas utilizados não apresentaram potencial terapêutico. Os pesquisadores avaliaram que a ausência de citotoxicidade da cisplatina em altas doses se devia a não liberação do mesmo pelos lipossomas (KIM *et al.*, 2001). Outro estudo, com resultados semelhantes, avaliou a ação antitumoral de lipossomas carregados com o fármaco pemetrexed (PMX) em modelos *in vivo* para mesotelioma maligno de pleura. Os pesquisadores utilizaram lipossomas com e sem colesterol e constataram que apenas os lipossomas sem colesterol foram capazes de inibir o crescimento tumoral, graças a rápida liberação de seu conteúdo (ANDO *et al.*, 2015).

No caso da doença de Pompe, os lipossomas devem ser capazes de garantir a liberação das enzimas encapsuladas em seu local de ação, o interior das vesículas lisossomais, para que haja eficácia terapêutica. Dessa forma, avaliamos o comportamento dos lipossomas em duas diferentes soluções de PBS. Incubamos amostras dos lipossomas contendo 60 µg/mL em PBS com pH fisiológico (pH = 7) e, de modo a simular o ambiente lisossomal, pH 4,9. As amostras foram mantidas por 1, 2 e 3 horas a 37°C. Então, os lipossomas foram retirados da solução por centrifugação tangencial e as amostras foram concentradas e analisadas por Bradford. Como visto na tabela 7, após 1 hora, 68% do conteúdo já havia sido liberado das vesículas, chegando a 88% após 3 horas (Tabela 7). Após 3 horas a 37°C em pH 7, a mesma solução de lipossomas apresentou liberação de 19% da GAA encapsulada.

Tabela 8 – Liberação da enzima GAA após 1, 2 e 3 horas em solução PBS de pH 4,9 a 37°C.

Tempo de incubação	1 horas	2 horas	3 horas
GAA livre	68%	81%	88%

4.4. Eficiência de funcionalização do anticorpo na superfície lipossomal

As células do corpo, de acordo com suas funções, apresentam diferenças em termos de expressão e marcadores de superfície. Dessa forma, diversas estratégias têm surgido na tentativa de modificar a superfície lipossomal, de modo a direcionar essas vesículas para sítios específicos de interesse. Tendo como referência a doença de Pompe, que, como a maioria das doenças de depósito lisossomal, tem ocorrência sistêmica, buscamos utilizar um receptor presente em todos os tecidos, principalmente nos músculos esqueléticos, fígado e células do sistema nervoso (HAVRANKOVA; ROTH; BROWNSTEIN, 1978; WATANABE *et al.*, 1998).

No presente estudo, os lipossomas foram funcionalizados com o anticorpo monoclonal anti-receptor de insulina humana, por ligação tioéter covalente com o grupo maleimida, ligado à extremidade distal dos lipídeos DSPE-PEG. Além do importante papel na estabilidade das formulações, as cadeias de PEG podem servir como âncoras para a funcionalização das NPs. A técnica de tiol-maleimida é amplamente utilizada em reações de bioconjugados por sua simplicidade e eficiência. O acoplamento do mab na ponta distal de um espaçador de PEG é preferível à conjugação direta aos lipídios da superfície do lipossoma, o que pode resultar em uma eficiência de acoplamento pobre devido à difícil acessibilidade dos grupos maleimida (HUWYLER; WU; PARDRIDGE, 1996; SALVATI *et al.*, 2013).

Para obter a eficiência da conjugação do anticorpo, a reação foi realizada em lipossomas vazios, evitando a medição inespecífica pelo método de Bradford. Ao fim da reação, o mab livre foi separado dos lipossomas por filtração tangencial em tubos de membrana de 300 kDa e concentrado no sistema de 10 kDa. Os lipossomas com o mab conjugado foram rompidos em solução contendo metanol (3:1), e o anticorpo+ foi concentrado e lavado por centrifugação tangencial em tubos de membrana de 10 kDa.

A eficiência da conjugação da maleimida com mab foi de 90,3% (Tabela 8), o que é satisfatório quando comparado a trabalhos semelhantes. Ulbrich e colaboradores (2011) promoveram a conjugação do mesmo anticorpo utilizado no presente estudo à superfície de nanopartículas de albumina humana. Seguindo o

mesmo protocolo com o reagente 2-iminotiolano, os pesquisadores obtiveram uma eficiência de 76% (ULBRICH; KNOBLOCH; KREUTER, 2011). Considerando a constante de Avogadro (aproximadamente 6×10^{23}) e a eficiência de funcionalização obtida foi possível determinar que cada lipossoma em solução deve conter aproximadamente 72 unidades de Mab em sua superfície. Outros trabalhos já demonstraram que NPs com densidade de ligantes próxima a encontrada em nosso estudo foram capazes de atravessar a BHE (HUWYLER; WU; PARDRIDGE, 1996; SALVATI *et al.*, 2013; VAN ROOY *et al.*, 2011).

Tabela 9 – Tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de funcionalização do Mab anti-insulina dos lipossomas vazios.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência da funcionalização (%)
Lipo-InsR	143	0,199	-27,4	90,3%

Para verificar se a integridade do anticorpo permaneceu intacta após incubação com o reagente 2-iminotiolano e analisar a funcionalização com os lipossomas, avaliamos as bandas características de um anticorpo monoclonal em eletroforese com gel de poliacrilamida. Para a reação foram avaliados o anticorpo em solução PBS (pH=7) e o anticorpo em solução PBS/EDTA, contendo, cada uma, 2 µg totais de proteína. A recuperação do anticorpo conjugado foi feita como descrito acima. Conforme observado na Figura 8, tanto o anticorpo incubado com o reagente, quanto aqueles recuperados após conjugação com os lipossomas, não apresentaram alteração no padrão de bandas quando comparados ao anticorpo controle. Conforme observado na Figura 8, tanto o anticorpo incubado com o reagente, quanto aqueles recuperados após conjugação com os lipossomas, não apresentaram alteração no padrão de bandas quando comparados ao anticorpo controle. Em condições redutoras, foi possível observar as bandas referentes às cadeias leve (25 kDa) e pesada (55 kDa) da imunoglobulina. Dessa forma, a reação não alterou a integridade dos anticorpos.

Figura 8. Eletroforese em SDS-PAGE com coloração em prata para a verificação da integridade do anti-receptor de insulina humano. Sendo anticorpo controle (A); anticorpo em solução com 2-iminotiolano (B); e anticorpo recuperado após funcionalização com os lipossomas (C).

Fonte: do autor

4.5. Ensaio de citotoxicidade

Inicialmente, a linhagem Ea.hy926 foi caracterizada quanto a sua cinética de crescimento. Seguindo as informações disponíveis na página referente a linhagem no banco de células ATCC, foram inoculadas $7,5 \times 10^4$ células em garrafas de 25 cm² com 4 mL de meio D-MEM contendo 10% de SFB (3×10^3 células/cm²).

Ao fim da fase exponencial de crescimento, a população alcançou a concentração final de $3,73 \times 10^6$ células, 168 horas após o início do cultivo, e o tempo de duplicação médio foi de 28,88 horas (Figura 9). Após 168 horas, o cultivo atingiu a fase de platô. No ponto de 192 horas houve uma aparente queda do número de células

que não se manteve nas fases finais do cultivo. O experimento foi encerrado após 240 horas. Durante todo o período de cultivo, a viabilidade celular permaneceu acima de 90%, estando acima de 95% durante toda a fase de crescimento.

Figura 9. Perfil e crescimento e viabilidade da linhagem celular endotelial Ea.hy926 durante 240 horas de cultivo.

Fonte: do autor

Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade das formulações lipossomais, com e sem o anticorpo funcionalizado, pelo método da Rezasurina na linhagem Ea.hy926. A viabilidade celular foi medida após 24 horas de contato das células com diferentes concentrações de lipossomas (de 5×10^6 até 1×10^{10}). Como visto na Figura 10, as formulações apresentaram baixa citotoxicidade em relação às células na maioria das concentrações testadas para ambas as formulações. Entretanto, a formulação

funcionalizada com o mab foi mais citotóxica quando comparado com os lipossomas não-funcionalizados. Os valores de IC₅₀ foram de $1,29 \times 10^9$ e $4,13 \times 10^8$ para os lipossomas sem e com o anticorpo funcionalizado, respectivamente. Dessa forma, os ensaios subseqüentes foram realizados com a concentração de 1×10^8 lipossomas.

Figura 10. Citotoxicidade das formulações lipossomais com e sem o anticorpo acoplado à superfície das partículas.

Fonte: do autor

4.6. Avaliação da internalização dos lipossomas por citometria de fluxo

A avaliação da internalização dos lipossomas foi feita por citometria de fluxo com lipossomas marcados com Rodamina B (Lipo-Ro), um marcador fluorescente amplamente utilizado para esse fim. A análise de *uptake* foi feita nos tempos de 1, 2, 4 e 24 horas para ambas as formulações lipossomais. Ao se considerar a porcentagem de células positivamente marcadas com rodamina, é possível notar que após apenas 1 hora os lipossomas não-funcionalizados já haviam sido internalizados por 90% das células (Figura 11A).

Já os lipossomas funcionalizados (Lipo-Ro-InsR) apresentaram diferença em relação ao controle apenas após 2 horas ($P < 0,0001$) e, após 4 horas, apresentaram mais de 90% das células positivas para a rodamina, quando não houve diferença em comparação com Lipo-Ro. (Figura 11B)

Figura 11. *Uptake* dos lipossomas pelas células endoteliais por citometria de fluxo. Porcentagem de células Ea.hy926 positivas para rodamina após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação com lipossomas não funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro) (A) e lipossomas funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro-InsR) (B).

Fonte: do autor

Buscando confirmar a rota de internalização utilizada pelos lipossomas funcionalizados, o ensaio de internalização foi repetido após incubação das células por 24 horas com meio D-MEM contendo insulina na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Como observado na Figura 12, após 24 horas de incubação, mais de 80% das células tratadas com Lipo-Ro eram positivas. Já as células que receberam os lipossomas funcionalizados (Lipo-Ro-InsR) apresentaram média de 31%. Esse resultado indica que a via de internalização dos lipossomas funcionalizados é a do receptor de insulina, já que a competição entre a insulina recombinante presente no meio de cultura e o mab presente na superfície dos lipossomas resultou em menores valores de *uptake*.

Figura 12. *Uptake* celular dos lipossomas pelas células Ea.hy926 após pré-tratamento das células com insulina recombinante humana (20 µg/mL) após 24 horas de incubação com lipossomas não funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro) e os lipossomas funcionalizados com anticorpo (Lipo-Ro-InsR). Os níveis de entrada dos lipossomas funcionalizados foram diminuídos pela presença da insulina no meio de cultura ($P < 0,0001$).

Fonte: do autor

As vias celulares de captação endocíticas são divididas em dois mecanismos principais. Geralmente, a captura de partículas pequenas (<500nm) é dependente de pinocitose, que pode ser mediada por clatrina ou caveolina, fagocitose e micropinocitose (KAFSHGARI; HARDING; VOELCKER, 2015). Como a via dependente de caveolina pode terminar em caveossomos, que não possuem marcadores intracelulares para endossomos e lisossomos, a via preferível no tratamento da doença de Pompe é a via mecanismo dependente de clatrina (PELKMAN; KARTENBECK; HELENIUS, 2001). A endocitose mediada por clatrina (EMC) está relacionada à ligação de macromoléculas, ou NPs funcionalizadas com ligantes, a receptores na superfície das células que geralmente entregam os materiais internalizados aos lisossomos (BONIFACINO; TRAUB, 2003; DOHERTY; MCMAHON,

2009). Em nosso estudo, o uso do anticorpo anti-receptor de insulina funcionalizado à superfície dos lipossomas visa explorar essa via endocítica por meio do receptor de insulina humana (Figura 13) (AZIZI *et al.*, 2015).

Figura 13. Esquema representando o caminho dos lipossomas funcionalizados para o interior das vesículas lisossomais após serem reconhecidos pelos receptores de insulina. O tratamento das células com insulina humana recombinante resultou na diminuição da internalização das vesículas pelas células endoteliais.

Fonte: do autor

A captação celular de partículas lipossômicas, revelada por citometria de fluxo, mostrou que, após apenas 1 hora de interação célula-lipossoma, a maioria dos

lipossomas portadores de rodamina (Lipo-Ro) foram internalizados pelas células endoteliais (Figura 11). No entanto, o Lipo-Ro-InsR demonstrou uma taxa de internalização mais lenta (Figura 11B). Embora células positivas tenham sido observadas após 1 hora de incubação com o Lipo-Ro-InsR, somente após 4 horas foi possível observar porcentagem ligeiramente maior de células positivas, quando comparada às células tratadas com Lipo-Ro (P de 0,049).

Essa diferença no tempo de captação pode estar relacionada às interações dinâmicas das quais depende a captação de uma NP pelas células. A endocitose mediada por clatrina realiza a captação dos lipossomas após sua ligação aos receptores de insulina dispostos na membrana das células em áreas com maior concentração dos receptores. Uma vez que a partícula se liga aos primeiros receptores, outros são atraídos para a zona de contato, onde se ligam aos demais ligantes na superfície da partícula (Figura 14). Esse movimento resulta em aumento da área de membrana celular em contato com a NP, levando a diminuição de receptores nas proximidades. Dependendo do tamanho da partícula a ser engolfada, os receptores precisam se difundir por uma distância maior, aumentando assim o tempo de empacotamento (GAO; SHI; FREUND, 2005).

Zhang e colaboradores (2009) demonstraram que existe uma barreira de energia associada à tensão da membrana e uma energia de adesão a ser superada entre eventos de ligação consecutivos (ZHANG *et al.*, 2009). Essa barreira de energia é relativamente pequena quando considerado um raio pequeno para uma NP, sendo o valor ótimo proposto em torno de 25 nm (GAO; SHI; FREUND, 2005; ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, com partículas de tamanho de 60 nm, já há uma competição pelos receptores livres na superfície da membrana celular, limitando o mecanismo endocítico. Além disso, quando a concentração de nanopartículas é pequena, é possível encontrar receptores suficientes para envolvê-las totalmente, tornando linear a relação entre a absorção celular e a concentração de receptores na superfície (ZHANG *et al.*, 2009). Dessa forma, com a alta concentração de lipossomas de tamanhos acima dos 100 nm usados em nosso estudo, a área total da membrana celular envolvida no processo de endocitose foi provavelmente distribuída e a taxa de captação celular diminuiu, o que não ocorreu com os lipossomas não-funcionalizados.

Figura 14. Esquema representando a formulação completa desenvolvida no presente trabalho. Após a ligação com os primeiros receptores de insulina na superfície das células, outros são atraídos para a zona de contato, onde se ligam aos demais ligantes na superfície da partícula.

Fonte: do autor

4.7. Colocalização das nanopartículas em lisossomos marcados

A eficiência da utilização dos lipossomos no caso da doença de Pompe depende da sua capacidade de entregar a enzima GAA no ambiente lisossomal. Dessa forma, buscamos determinar o nível de colocalização dos lipossomos com os lisossomos utilizando o marcador fluorescente LysoTracker™ Green DND-26. Essa sonda é seletiva para organelas acídicas e, dessa forma, capaz de marcar os endossomos/lisossomos em concentrações nanomolares de até 50 nM.

De modo a determinar as condições ótimas de marcação dos lisossomos em cultura de células Ea.hy926, foram analisadas 3 concentrações de LysoTracker em 3 tempos diferentes. A Figura 15 mostra as condições em que foi possível mensurar a fluorescência das células por microscopia confocal corrigida pela fluorescência das células sem LysoTracker. Como observado na Figura 15, as 3 condições que apresentaram os maiores valores de fluorescência foram a de 30 min com 200 mM de LysoTracker e as de 60 min com 50 e 75 mM de LysoTracker. Como não houve diferença entre essas medidas, a condição escolhida para os experimentos subsequentes foi a de 60 minutos de incubação com solução 75 mM de LysoTracker, já que essa condição apresentou menor variabilidade dos dados (DP de 5,112 e EP de 1,044).

Figura 15. Fluorescência resultante de diferentes parâmetros de tempo e concentração de LysoTracker Green para a marcação dos lisossomos das células endoteliais. CTCF (*Corrected Total Cellular Fluorescence*).

Fonte: do autor

A fim de determinar a colocação de duas fluorescências diversos coeficientes podem ser utilizados, sendo os principais o coeficiente de correlação de Pearson

(PCC, *Pearson correlation coefficient*) e o coeficiente de colocalização de Manders (MOC, *Mander's overlap coefficient*). O PCC é o coeficiente de correlação da reta obtida pela regressão linear da distribuição das medidas de intensidade de pixel de cada canal de fluorescência. Como o PCC mede a covariância entre pixels em duas imagens, a medida utilizada independe da intensidade do sinal medido. Os valores obtidos variam de -1 a 1, entretanto, apenas os valores entre 0 e 1 tem significado claro, sendo 0 o resultado para a ausência de correlação e 1 o resultado para total correlação. Como o PCC mede apenas a adequabilidade das medidas em uma relação linear, ele resulta em uma medida incompleta em situações complexas, como nos casos em que as sondas são encontradas em diferentes proporções nos compartimentos celulares (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011).

Relacionada ao PCC, a segunda métrica utilizada, o MOC, permite analisar a fração de uma marcação que ocorre paralelamente com uma segunda marcação independentemente da proporção da intensidade do sinal de ambas. Dessa forma, para essa análise, é necessário corrigir as imagens para retirar os ruídos inespecíficos que aparecem nas regiões de não interesse. Dessa análise resultam dois valores que variam entre 0 e 1: considerando dois canais, verde e vermelho, M1 representa a fração de sinal verde que ocorre nos locais de sinal vermelho, e M2, que representa a fração de sinal vermelho que ocorre nos locais de sinal verde (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011).

O grau de colocalização dos lipossomas marcados com rodamina em relação aos lisossomos marcados com LysoTracker foi determinado a partir das imagens obtidas por microscopia confocal. A análise foi feita no software FIJI (*FIJI IS JUST IMAGEJ*), utilizando o plugin Coloc2, e determinando a região de interesse a ser analisada individualmente para cada célula presente no campo da imagem. O estudo foi feito utilizando o método de Costes (COSTES *et al.*, 2004), direto do FIJI, de modo a diminuir a influência das marcações inespecíficas que ocorrem naturalmente em imagens de biologia celular. No presente trabalho, os valores de MOC utilizados referem-se à colocalização do canal vermelho (rodamina) em relação ao canal verde (lisossomos), e são referidos como tM2 (t para *threshold*) para indicar que os ruídos de fundo nas imagens foram zerados (Figura 16).

Figura 16. Microscopia confocal das células Ea.hy926 incubadas com lipossomas funcionalizados e não funcionalizados carregando rodamina por 4 e 24 horas. As células tiveram os núcleos corados com DAPI (azul) e os lisossomos corados com Lysotracker® Green (verde). A colocação foi avaliada pela sobreposição da rodamina (vermelho) com os lisossomos (verde) pelo método de Costes. Barra de escala = 20 µm.

Fonte: do autor

Conforme disposto na Tabela 9, ambas as formulações foram encontradas nos lisossomos das células endoteliais com valores de colocalização próximos de 1. Após os tratamentos das células com os Lipo-Ro, não houve diferença nos índices de PCC e MOC entre os tempos de 4 e 24 horas. O mesmo foi verdadeiro para as células tratadas com os lipossomas funcionalizados. Dessa forma, ambas as formulações apresentam potencial para atingir os lisossomos com valores satisfatórios. No trabalho de Hsu e colaboradores com NPs poliméricas, a via de internalização explorada foi a mediada pela proteína de adesão celular, cujo receptor de membrana fica superexpresso em situações inflamatórias. Em células HUVEC com acúmulo de glicogênio no interior dos lisossomos, os valores de colocalização foram de 64,6% e 77,3% após 3 e 5 horas de incubação, respectivamente (HSU *et al.*, 2012).

Tabela 10 – Análise da colocalização da rodamina com os lisossomos marcados com a sonda ácida LysoTracker® Green após 4 e 24 horas.

Análise	Formulação	4 horas	24 horas
PCC	Lipo-Ro	0,776	0,721
	Lipo-Ro-InsR	0,877	0,912
MOC (tM2)	Lipo-Ro	0,960	0,950
	Lipo-Ro-InsR	0,980	0,990

A presença dos lipossomas não funcionalizados nos lisossomos corrobora outros estudos que demonstraram que a entrada de lipossomas nas células ocorre por diferentes vias endocíticas, como a mediada por clatrina, vias micropinocíticas e vias independentes de clatrina e caveolina (ALSHEHRI; GRABOWSKA; STOLNIK, 2018; STRAUBINGER *et al.*, 1983). Além disso, os altos valores de colocalização para o Lipo-Ro podem estar relacionados ao tipo de célula utilizada em nossos experimentos, uma vez que diferentes tipos celulares podem apresentar rotas de internalização distintas para as mesmas nanopartículas (ZHAO; STENZEL, 2018). Huth e colaboradores mostraram que a internalização de lipossomas pode ocorrer por endocitose mediada tanto por caveolina como por clatrina em culturas de células COS 7 (fibroblastos renais transformados de macaco) e HUVEC (células endoteliais de condão umbilical humano) (HUTH; SCHUBERT; PESCHKA-SÜSS, 2006), que é a fonte original da linhagem celular endotelial usada em nosso estudo (BOUÏS *et al.*,

2001). Usando nanopartículas lipídicas para entregar siRNA, Gilleron e colaboradores demonstraram que a captação dessas nanopartículas por células HeLa foi mediada por micropinocitose, enquanto células NIH3T3 (fibroblastos de camundongo) internalizaram as mesmas nanopartículas por endocitose mediada por clatrina (GILLERON *et al.*, 2013).

No presente estudo, apesar de ambos os sistemas lipossomais apresentarem valores de colocalização elevados, a incubação das células com os lipossomas funcionalizados com anti-InsR resultou em valores de colocalização maiores em 4 e 24 horas quando comparados aos lipossomas não-funcionalizados ($P < 0,0001$).

Embora diferentes tipos de células apresentem variações em relação aos tipos de receptores de membrana, o receptor de insulina é conhecido por ser amplamente expresso em todas as células de mamíferos, incluindo as células endoteliais do SNC, sendo um dos alvos mais estudados na tentativa de atravessar a barreira hematoencefálica (LAJOIE; SHUSTA, 2015; SPENCER *et al.*, 2018; UCHIDA *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado que a peguilação por si só não permite que NPs cruzem a BHE (HU *et al.*, 2011; LI, JINGWEI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013).

Dessa forma, apesar de ambas as formulações lipossomais desenvolvidas terem sido capazes de atingir os lisossomos, é possível esperar que, em futuros ensaios *in vivo*, apenas os lipossomas funcionalizados com o anti-receptor de insulina sejam internalizados pelas células endoteliais que compõem a BHE pela via de transcitose, atingindo os tecidos do SNC.

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de sistemas lipossomais para o carregamento da enzima alfa-glucosidase ácida surge como uma alternativa para superar as dificuldades da administração da enzima livre na circulação sanguínea de pacientes da doença de Pompe.

No presente trabalho, foi possível otimizar os parâmetros da manufatura dos lipossomas, de modo a obter uma população monomodal com tamanho e polidispersividade adequados para a administração intravenosa, necessária para a reposição enzimática. Além disso, a eficiência de encapsulação obtida mostrou que 90% das enzimas foram encapsuladas no interior aquoso das vesículas.

De modo a explorar a possibilidade de direcionar os lipossomas para vias específicas de internalização celular, promoveu-se, com alta eficiência (90,3%), a funcionalização de um anticorpo monoclonal na superfície lipossomal. O anti-receptor de insulina humana foi acoplado com ligação forte ao grupamento maleimida presente na extremidade distal da cadeia PEG de um dos lipídeos componentes da formulação.

O direcionamento do sistema para a via de internalização do receptor de insulina humana é extremamente vantajoso na terapia para a doença de Pompe, já que é um receptor presente em todas as células e está associado à transcitose nas células da barreira hematoencefálica. Com os ensaios *in vitro*, foi possível demonstrar que o sistema desenvolvido é capaz de adentrar as células e se colocalizar com os lisossomos, onde, possivelmente, será capaz de liberar as enzimas em pH ácido.

Estudos futuros de eficácia em modelos *in vitro* e *in vivo* para a doença de Pompe serão necessários para uma efetiva compreensão dos sistemas desenvolvidos, tanto em relação à degradação do glicogênio acumulado nos lisossomos quanto a biodistribuição dos lipossomas em organismos complexos.

Com isso, os resultados aqui apresentados demonstraram que o sistema lipossomal desenvolvido tem potencial para otimizar a TRE para a doença de Pompe, bem como outras doenças do depósito lisossomal.

6. REFERÊNCIAS

ABASOLO, I. *et al.* Nanotechnology-based approaches for treating lysosomal storage disorders, a focus on Fabry disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, p. e1684, 13 dez. 2020.

ADISESHAIAH, P. P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 2, n. 1, p. 99–112, jan. 2010.

AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, v. 8, n. 1, p. 102, 22 fev. 2013.

ALMEIDA, B. *et al.* Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)*. [S.l.]: NLM (Medline). , 1 dez. 2020

ALSHEHRI, A.; GRABOWSKA, A.; STOLNIK, S. Pathways of cellular internalisation of liposomes delivered siRNA and effects on siRNA engagement with target mRNA and silencing in cancer cells. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 3748, 28 dez. 2018.

AMALFITANO, A. *et al.* Recombinant human acid α -glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: Results of a phase I/II clinical trial. *Genetics in Medicine*, v. 3, n. 2, p. 132–138, mar. 2001.

ANDO, H. *et al.* Advanced therapeutic approach for the treatment of malignant pleural mesothelioma via the intrapleural administration of liposomal pemetrexed. *Journal of Controlled Release*, v. 220, p. 29–36, 28 dez. 2015.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine*, v. 4, n. 3, set. 2019.

AZIZI, P. M. *et al.* Clathrin-dependent entry and vesicle-mediated exocytosis define insulin transcytosis across microvascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 26, n. 4, p. 740–750, 15 fev. 2015.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, v. 8, n. 5, p. 660–668, maio 1964.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, n. 1, p. 238–252, 1 ago. 1965.

BANUGARIA, S. G. *et al.* The impact of antibodies on clinical outcomes in diseases treated with therapeutic protein: Lessons learned from infantile Pompe disease. *Genetics in Medicine*, v. 13, n. 8, p. 729–736, ago. 2011.

BARENHOLZ, Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 160, n. 2, p. 117–34, 10 jun. 2012.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167–179, jun. 2007.

BELLOTTI, A. S. *et al.* *Molecular Approaches for the Treatment of Pompe Disease*. *Molecular Neurobiology*. [S.l.]: Springer. , 1 fev. 2020

BELTRÁN-GRACIA, E. *et al.* *Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications*. *Cancer Nanotechnology*. [S.l.]: BioMed Central Ltd. , 19 dez. 2019

BENJAMIN, E. R. *et al.* Co-administration with the pharmacological chaperone AT1001 increases recombinant human α -galactosidase A tissue uptake and improves substrate reduction in Fabry mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 20, n. 4, p. 717–26, abr. 2012.

BOADO, R. J. *et al.* Bi-functional IgG-lysosomal enzyme fusion proteins for brain drug delivery. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

BOADO, R. J. *et al.* Genetic engineering of a lysosomal enzyme fusion protein for targeted delivery across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and bioengineering*, v. 99, n. 2, p. 475–84, 1 mar. 2008.

BOADO, R. J.; PARDRIDGE, W. M. Brain and organ uptake in the Rhesus monkey in vivo of recombinant iduronidase compared to an insulin receptor antibody-iduronidase fusion protein. *Molecular Pharmaceutics*, v. 14, n. 4, p. 1271–1277, 2017.

BONIFACINO, J. S.; TRAUB, L. M. *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. Annual Review of Biochemistry*. [S.l.]: Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. , 28 nov. 2003

BOUÏS, D. *et al.* Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, v. 4, n. 2, p. 91–102, 2001.

BRANDL, M. Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnology annual review*, v. 7, p. 59–85, 2001.

BRAVO, H. *et al.* Investigation of newborns with abnormal results in a newborn screening program for four lysosomal storage diseases in Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, v. 12, p. 92–97, 1 set. 2017.

BULBAKE, U. *et al.* Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, v. 9, n. 4, p. 12, 27 mar. 2017.

CABRERA, I. *et al.* α -Galactosidase-A Loaded-Nanoliposomes with Enhanced Enzymatic Activity and Intracellular Penetration. *Advanced Healthcare Materials*, v. 5, n. 7, p. 829–840, abr. 2016.

CHEN, H. H. *et al.* Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidoses; past, present, and future. *Journal of Human Genetics*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 nov. 2019

CHEN, W. *et al.* Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 14815, 1 dez. 2018.

CHIEN, Y.-H. *et al.* Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics*, v. 124, n. 6, p. e1116-25, dez. 2009.

CHIEN, Y.-H.; HWU, W.-L.; LEE, N.-C. Newborn screening: Taiwanese experience. *Annals of Translational Medicine*, v. 7, n. 13, p. 7, 2019.

Consulta Pública avalia PCDT para doença de Pompe. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/consulta-publica-avalia-pcdt-para-doenca-de-pompe>>. Acesso em: 11 maio 2020.

COSTA, J. DE O.; LEMOS, L. L. P. DE; GUERRA JÚNIOR, A. A. *Alfa- α -glucosidase no tratamento da Doença de Pompe Alglucosidase alfa in Pompe's disease treatment Alfa-glucosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Pompe*. . Belo Horizonte: [s.n.], 2014.

COSTES, S. V. *et al.* Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical Journal*, v. 86, n. 6, p. 3993–4003, 2004.

CZEKAY, R. P. *et al.* Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: dissociation of the complexes in late endosomes. *Molecular biology of the cell*, v. 8, n. 3, p. 517–32, mar. 1997.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DASOUKI, M. *et al.* Pompe disease: literature review and case series. *Neurologic clinics*, v. 32, n. 3, p. 751–76, ix, ago. 2014.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 7, n. 9, p. 771–82, set. 2008.

DEL MORAL, S.; BARRADAS-DERMITZ, D. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Production and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* ITV-01 isolated from sugar cane bagasse. *3 Biotech*, v. 8, n. 1, p. 7, 11 jan. 2018.

DERUISSEAU, L. R. *et al.* Neural deficits contribute to respiratory insufficiency in Pompe disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 23, p. 9419–24, 9 jun. 2009.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. *Mechanisms of endocytosis. Annual Review of Biochemistry*. [S.l.]: Annual Reviews. , 2 jun. 2009

DROST, M. R. *et al.* Both type 1 and type 2a muscle fibers can respond to enzyme therapy in Pompe disease. *Muscle & nerve*, v. 37, n. 2, p. 251–5, fev. 2008.

DUNN, K. W.; KAMOCKA, M. M.; MCDONALD, J. H. *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. American Journal of Physiology - Cell Physiology*. [S.l.]: American Physiological Society. , abr. 2011

FDA. *FDA expands approval of drug to treat Pompe disease to patients of all ages; removes risk mitigation strategy requirements.* Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm407563.htm>>.

Acesso em: 6 jun. 2016.

FERVENZA, F. C.; TORRA, R.; WARNOCK, D. G. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in the nephropathy of Fabry disease. *Biologics : targets & therapy*, v. 2, n. 4, p. 823–43, dez. 2008.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical research*, v. 27, n. 5, p. 796–810, maio 2010.

FUNK, B. *et al.* Expression of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in multiple human tissues during fetal life and early infancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 75, n. 2, p. 424–31, ago. 1992.

GAO, H.; SHI, W.; FREUND, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 27, p. 9469–9474, 5 jul. 2005.

GARNACHO, C. *et al.* Enhanced Delivery and Effects of Acid Sphingomyelinase by ICAM-1-Targeted Nanocarriers in Type B Niemann-Pick Disease Mice. *Molecular Therapy*, v. 25, n. 7, p. 1686–1696, 5 jul. 2017.

GARNACHO, C.; MURO, S. ICAM-1 targeting, intracellular trafficking, and functional activity of polymer nanocarriers coated with a fibrinogen-derived peptide for lysosomal enzyme replacement. *Journal of Drug Targeting*, v. 25, n. 9–10, p. 786–795, nov. 2017.

GEEL, T. M. *et al.* Pompe disease: current state of treatment modalities and animal models. *Molecular genetics and metabolism*, v. 92, n. 4, p. 299–307, dez. 2007.

GILLERON, J. *et al.* Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 7, p. 638–646, jul. 2013.

GIUGLIANI, R. *et al.* Neurocognitive and somatic stabilization in pediatric patients with severe Mucopolysaccharidosis Type i after 52 weeks of intravenous brain-penetrating insulin receptor

antibody-iduronidase fusion protein (valanafusp alpha): An open label phase 1-2 trial. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 13, n. 1, 5 jul. 2018.

GU, Z. *et al.* *Liposome-based drug delivery systems in cancer immunotherapy. Pharmaceutics*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 nov. 2020

GÜNGÖR, D. *et al.* Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 6, p. 34, 2011.

HAGEMANS, M. L. C. *et al.* Late-onset Pompe disease primarily affects quality of life in physical health domains. *Neurology*, v. 63, n. 9, p. 1688–92, 9 nov. 2004.

HAHN, A.; SCHÄNZER, A. Long-term outcome and unmet needs in infantile-onset Pompe disease. *Annals of Translational Medicine*, v. 7, n. 13, p. 283–283, jul. 2019.

HAS, C.; SUNTHAR, P. *A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. Journal of Liposome Research*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 1 out. 2020

HAVRANKOVA, J.; ROTH, J.; BROWNSTEIN, M. *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. Nature*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 27 abr. 1978

HSU, J. *et al.* Enhanced delivery of α -glucosidase for Pompe disease by ICAM-1-targeted nanocarriers: comparative performance of a strategy for three distinct lysosomal storage disorders. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 8, n. 5, p. 731–9, jul. 2012.

HU, K. *et al.* Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: Preparation, characterization and efficacy in Parkinsons disease. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 415, n. 1–2, p. 273–283, 30 ago. 2011.

HUG, G.; SCHUBERT, W. K. Lysosomes in type II glycogenosis. Changes during administration of extract from *Aspergillus niger*. *The Journal of cell biology*, v. 35, n. 1, p. C1–6, out. 1967.

HUTH, U. S.; SCHUBERT, R.; PESCHKA-SÜSS, R. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *Journal of Controlled Release*, v. 110, n. 3, p. 490–504, 21 fev. 2006.

HUWYLER, J.; WU, D.; PARDRIDGE, W. M. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 24, p. 14164–14169, 26 nov. 1996. Acesso em: 18 maio 2020.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, v. 1, n. 3, p. 297–315, 2006.

JØLCK, R. I. *et al.* Engineering liposomes and nanoparticles for biological targeting. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, v. 125, p. 251–80, 2011.

KAFSHGARI, M.; HARDING, F.; VOELCKER, N. Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles. *Current Drug Delivery*, v. 12, n. 1, p. 63–77, 10 mar. 2015.

KANTERS, T. A. *et al.* Burden of illness of Pompe disease in patients only receiving supportive care. *Journal of inherited metabolic disease*, v. 34, n. 5, p. 1045–52, out. 2011.

KANTERS, T. A. *et al.* Cost-effectiveness of enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in classic-infantile patients with Pompe disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 9, n. 1, 16 maio 2014.

KAZI, Z. B. *et al.* Sustained immune tolerance induction in enzyme replacement therapy-treated CRIM-negative patients with infantile Pompe disease. *JCI insight*, v. 2, n. 16, 17 ago. 2017.

KIKUCHI, T. *et al.* Clinical and metabolic correction of pompe disease by enzyme therapy in acid maltase-deficient quail. *The Journal of clinical investigation*, v. 101, n. 4, p. 827–33, 15 fev. 1998.

KIM, E. S. *et al.* A phase II study of STEALTH cisplatin (SPI-77) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, v. 34, n. 3, p. 427–432, 2001.

KISHNANI, P. S. *et al.* Recombinant human acid α -glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*, v. 68, n. 2, p. 99–109, 2007.

KISHNANI, PRIYA S *et al.* Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Molecular genetics and metabolism*, v. 99, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.

KISHNANI, PRIYA S *et al.* Early treatment with alglucosidase alpha prolongs long-term survival of infants with Pompe disease. *Pediatric research*, v. 66, n. 3, p. 329–35, set. 2009.

KISHNANI, PRIYA S. *et al.* Immune response to enzyme replacement therapies in lysosomal storage diseases and the role of immune tolerance induction. , 1 fev. 2016, p. 66–83.

KISHNANI, PRIYA SUNIL *et al.* Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid α -glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *The Journal of Pediatrics*, v. 149, n. 1, p. 89–97, 2006.

KOHLER, L.; PUERTOLLANO, R.; RABEN, N. *Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. Neurotherapeutics*. [S.l.]: Springer New York LLC. , 14 out. 2018

LA BAUVE, E. *et al.* Method for measuring the unbinding energy of strongly-bound membrane-associated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1858, n. 11, p. 2753–2762, 1 nov. 2016.

LAJOIE, J. M.; SHUSTA, E. V. *Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. [S.l.]: Annual Reviews Inc. , 6 jan. 2015

LANDI-LIBRANDI, A. P. *et al.* *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP–H₂O₂–luminol system. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n. 4, p. 258–267, 17 jun. 2011.

LE, S. Q. *et al.* A Humoral Immune Response Alters the Distribution of Enzyme Replacement Therapy in Murine Mucopolysaccharidosis Type I. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, v. 8, p. 42–51, 16 mar. 2018.

LI, JING *et al.* *A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [S.l.]: Shenyang Pharmaceutical University. , 1 abr. 2015

LI, JINGWEI *et al.* Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials*, v. 32, n. 21, p. 4943–4950, jul. 2011.

LI, MINDY. Enzyme replacement therapy: A review and its role in treating lysosomal storage diseases. *Pediatric Annals*, v. 47, n. 5, p. e191–e197, 1 maio 2018.

LI, MINGYUAN *et al.* *Composition design and medical application of liposomes. European Journal of Medicinal Chemistry.* [S.I.]: Elsevier Masson SAS. , 15 fev. 2019

LIU, Z. *et al.* B6 peptide-modified PEG-PLA nanoparticles for enhanced brain delivery of neuroprotective peptide. *Bioconjugate Chemistry*, v. 24, n. 6, p. 997–1007, 19 jun. 2013.

MA, X. *et al.* Future of nanotherapeutics: Targeting the cellular sub-organelles. *Biomaterials*, v. 97, p. 10–21, 2016.

MECHLER, K. *et al.* Pressure for drug development in lysosomal storage disorders – a quantitative analysis thirty years beyond the US orphan drug act. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 10, n. 1, p. 46, 18 dez. 2015.

MEENA, N. K.; RABEN, N. *Pompe disease: New developments in an old lysosomal storage disorder. Biomolecules.* [S.I.]: MDPI AG. , 1 set. 2020

MILIC-EMILI, J.; WHITELAW, W. A.; DERENNE, J. P. New tests to assess lung function: occlusion pressure--a simple measure of the respiratory center's output. *The New England journal of medicine*, v. 293, n. 20, p. 1029–30, 13 nov. 1975.

MORELAND, R. J. *et al.* Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *The Journal of biological chemistry*, v. 280, n. 8, p. 6780–91, 25 fev. 2005.

MÜLLER-FELBER, W. *et al.* Late onset Pompe disease: Clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscular Disorders*, v. 17, n. 9–10, p. 698–706, out. 2007.

MUMTAZ, S.; BACHHAWAT, B. K. Enhanced intracellular stability and efficacy of PEG modified dextranase in the treatment of a model storage disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1199, n. 2, p. 175–182, mar. 1994.

MURO, S. *et al.* Control of Endothelial Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and Shape of ICAM-1-targeted Carriers. *Molecular Therapy*, v. 16, n. 8, p. 1450–1458, 17 ago. 2008.

MURO, S. New biotechnological and nanomedicine strategies for treatment of lysosomal storage disorders. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, v. 2, n. 2, p. 189–204, jan. 2010.

MURO, S.; SCHUCHMAN, E. H.; MUZYKANTOV, V. R. Lysosomal enzyme delivery by ICAM-1-targeted nanocarriers bypassing glycosylation- and clathrin-dependent endocytosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 13, n. 1, p. 135–41, jan. 2006.

NAG, O.; AWASTHI, V. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics*, v. 5, n. 4, p. 542–569, 25 out. 2013.

NAGURA, H.; HOKUGO, J.; UEDA, K. Long-Term Observation of the Safety and Effectiveness of Enzyme Replacement Therapy in Japanese Patients with Pompe Disease: Results From the Post-marketing Surveillance. *Neurology and Therapy*, v. 8, n. 2, p. 397–409, 1 dez. 2019.

NISINI, R. *et al.* The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. FEB, p. 155, 5 fev. 2018.

ORÄDD, G.; LINDBLOM, G.; WESTERMAN, P. W. Lateral diffusion of cholesterol and dimyristoylphosphatidylcholine in a lipid bilayer measured by pulsed field gradient NMR spectroscopy. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 5, p. 2702–2704, 1 nov. 2002.

OSBORN, M. J. *et al.* Targeting of the CNS in MPS-IH using a nonviral transferrin-alpha-L-iduronidase fusion gene product. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 16, n. 8, p. 1459–66, ago. 2008.

PARDRIDGE, W. M. Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Current opinion in pharmacology*, v. 6, n. 5, p. 494–500, out. 2006.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. *New Developments in Liposomal Drug Delivery. Chemical Reviews*. [S.l.]: American Chemical Society. , 2015a

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 19, p. 10938–10966, 14 out. 2015b.

PELKMANS, L.; KARTENBECK, J.; HELENIUS, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, v. 3, n. 5, p. 473–483, 18 abr. 2001.

PEREIRA, S. J.; BERDITCHEVSKY, C. R.; MARIE, S. K. N. Report of the first Brazilian infantile Pompe disease patient to be treated with recombinant human acid alpha-glucosidase. *Jornal de Pediatria*, v. 84, n. 3, p. 272–275, maio 2008.

PLATT, F. M. *et al.* Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 dez. 2018

PORTO, C. *et al.* Pharmacological enhancement of α -glucosidase by the allosteric chaperone N-acetylcysteine. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 20, n. 12, p. 2201–11, dez. 2012.

PREDESCU, D.; VOGEL, S. M.; MALIK, A. B. Functional and morphological studies of protein transcytosis in continuous endothelia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, v. 287, n. 5, p. L895-901, nov. 2004.

PRINCE, W. S. *et al.* Lipoprotein receptor binding, cellular uptake, and lysosomal delivery of fusions between the receptor-associated protein (RAP) and alpha-L-iduronidase or acid alpha-glucosidase. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 33, p. 35037–46, 13 ago. 2004.

RABEN, N. *et al.* Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. *Molecular genetics and metabolism*, v. 80, n. 1–2, p. 159–69, jan. 2003.

RANE, S.; PRABHAKAR, B. Optimization of paclitaxel containing pH-sensitive liposomes by 3 factor, 3 level box-behnken design. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 4, p. 420–426, jul. 2013.

RAPPAPORT, J. *et al.* Altered Clathrin-Independent Endocytosis in Type A Niemann-Pick Disease Cells and Rescue by ICAM-1-Targeted Enzyme Delivery. 2015.

RATNER, M. Genzyme's Lumizyme clears bioequivalence hurdles. *Nature Biotechnology*, v. 27, n. 8, p. 685–685, ago. 2009.

RIEHMANN, K. *et al.* Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v. 48, n. 5, p. 872–97, 2009.

RIP, J. *et al.* Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood–brain barrier in rats. *Journal of Drug Targeting*, v. 22, n. 5, p. 460–467, 14 jun. 2014.

ROIG-ZAMBONI, V. *et al.* Structure of human lysosomal acid α -glucosidase-A guide for the treatment of Pompe disease. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2017.

ROSSI, M. *et al.* Long-term enzyme replacement therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase derived from chinese hamster ovary cells. *Journal of child neurology*, v. 22, n. 5, p. 565–73, maio 2007.

SALVALAIO, M. *et al.* Targeted Polymeric Nanoparticles for Brain Delivery of High Molecular Weight Molecules in Lysosomal Storage Disorders. *PLOS ONE*, v. 11, n. 5, p. e0156452, 26 maio 2016.

SALVATI, E. *et al.* Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- β peptide: The chemical design affects the permeability across an in vitro model. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 1749–1758, 3 maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23674890/>>. Acesso em: 9 set. 2020.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, V.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M.; GÓMEZ-HENS, A. Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system. *Analytica Chimica Acta*, v. 645, n. 1–2, p. 79–85, 10 jul. 2009.

SCHNEIDER, I. *et al.* Respiratory function in late-onset Pompe disease patients receiving long-term enzyme replacement therapy for more than 48 months. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, v. 163, n. 1–2, p. 40–4, jan. 2013.

SCHNEIDER, J. L.; DINGMAN, R. K.; BALU-IYER, S. V. Lipidic Nanoparticles Comprising Phosphatidylinositol Mitigate Immunogenicity and Improve Efficacy of Recombinant Human Acid Alpha-Glucosidase in a Murine Model of Pompe Disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, n. 3, p. 831–837, 1 mar. 2018.

SCHOSER, B. *et al.* A Systematic Review of the Health Economics of Pompe Disease. *PharmacoEconomics - Open*, p. 1–15, 2 maio 2019.

SCHOSER, B.; STEWART, A.; *et al.* Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe disease following α -glucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*. [S.l.]: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. , 1 abr. 2017

SCHOSER, B.; BILDER, D. A.; *et al.* The humanistic burden of Pompe disease: are there still unmet needs? A systematic review. *BMC Neurology*, v. 17, n. 1, p. 202, 22 dez. 2017.

SCHOSER, B.; HILL, V.; RABEN, N. Therapeutic approaches in glycogen storage disease type II/Pompe Disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 5, n. 4, p. 569–78, out. 2008.

SCHUH, R. S.; BALDO, G.; TEIXEIRA, H. F. *Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses. Expert Opinion on Drug Delivery*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 1 dez. 2016

SERCOMBE, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in pharmacology*, v. 6, p. 286, 2015.

SHI, J. *et al.* Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters*, v. 10, n. 9, p. 3223–30, 8 set. 2010.

SPENCER, B. *et al.* Identification of Insulin Receptor Splice Variant B in Neurons by in situ Detection in Human Brain Samples. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 4070, 1 dez. 2018.

STEGER, L. D.; DESNICK, R. J. Enzyme therapy VI: Comparative in vivo fates and effects on lysosomal integrity of enzyme entrapped in negatively and positively charged liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 464, n. 3, p. 530–546, fev. 1977.

STEVENS, T. *et al.* Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, v. 279, n. 3, p. L419-22, out. 2000.

STRAUBINGER, R. M. *et al.* Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*, v. 32, n. 4, p. 1069–79, abr. 1983.

TAJIMA, Y. *et al.* Structural and biochemical studies on Pompe disease and a “pseudodeficiency of acid alpha-glucosidase”. *Journal of human genetics*, v. 52, n. 11, p. 898–906, jan. 2007.

TAM, V. H. *et al.* Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 30 dez. 2016

TANCINI, B. *et al.* Use of polylactide-co-glycolide-nanoparticles for lysosomal delivery of a therapeutic enzyme in glycogenosis type II fibroblasts. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, n. 4, p. 2657–2666, 1 abr. 2015.

THEKKEDATH, R.; KOSHKARYEV, A.; TORCHILIN, V. P. Lysosome-targeted octadecyl-rhodamine B-liposomes enhance lysosomal accumulation of glucocerebrosidase in Gauchers cells in vitro. *Nanomedicine*, v. 8, n. 7, p. 1055–1065, 2013.

TOH, M.-R.; CHIU, G. N. C. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 88–95, 2013.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 4, n. 2, p. 145–60, fev. 2005.

TOSCANO, A.; RODOLICO, C.; MUSUMECI, O. Multisystem late onset Pompe disease (LOPD): an update on clinical aspects. *Annals of Translational Medicine*, v. 7, n. 13, p. 284–284, jul. 2019.

TOSCANO, A.; SCHOSER, B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *Journal of neurology*, v. 260, n. 4, p. 951–9, abr. 2013.

UCHIDA, Y. *et al.* Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *Journal of Neurochemistry*, v. 117, n. 2, p. 333–345, abr. 2011.

ULBRICH, K.; KNOBLOCH, T.; KREUTER, J. Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Journal of drug targeting*, v. 19, n. 2, p. 125–32, fev. 2011.

URAYAMA, A. *et al.* Mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of sulfamidase across the blood-brain barrier in the newborn mouse. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 16, n. 7, p. 1261–6, jul. 2008.

VAN DEN HOUT, H. *et al.* Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet (London, England)*, v. 356, n. 9227, p. 397–8, 29 jul. 2000.

VAN DEN HOUT, H. M. P. *et al.* The natural course of infantile Pompe's disease: 20 Original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics*, v. 112, n. 2 I, p. 332–340, 1 ago. 2003.

VAN DEN HOUT, J. M. P. *et al.* Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics*, v. 113, n. 5, p. e448-57, maio 2004.

VAN DER BEEK, N. A. M. E. *et al.* *Pompe disease (glycogen storage disease type II): Clinical features and enzyme replacement therapy*. *Acta Neurologica Belgica*. [S.l.]: Springer-Verlag Italia s.r.l. , 2006

VAN GELDER, C. M. *et al.* Effects of a higher dose of alglucosidase alfa on ventilator-free survival and motor outcome in classic infantile Pompe disease: an open-label single-center study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 39, n. 3, p. 383–390, 1 maio 2016.

VAN ROOY, I. *et al.* Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. *Journal of Controlled Release*, v. 150, n. 1, p. 30–36, 28 fev. 2011. Acesso em: 27 jul. 2021.

VANHERPE, P. *et al.* Late-onset Pompe disease (LOPD) in Belgium: clinical characteristics and outcome measures. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 15, n. 1, p. 83, 5 abr. 2020.

WAGNER, V. *et al.* The emerging nanomedicine landscape. *Nature biotechnology*, v. 24, n. 10, p. 1211–7, out. 2006.

WASSERSTEIN, M. P. *et al.* The New York pilot newborn screening program for lysosomal storage diseases: Report of the First 65,000 Infants. *Genetics in Medicine*, v. 21, n. 3, p. 631–640, 1 mar. 2019.

WATANABE, M. *et al.* Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 2, p. 243–256, fev. 1998.

WENK, J.; HILLE, A.; VON FIGURA, K. Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues. *Biochemistry international*, v. 23, n. 4, p. 723–31, mar. 1991.

WYATT, K. *et al.* The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: A longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. *Health Technology Assessment*, v. 16, n. 39, p. 1–566, 2012.

XIAO, K. *et al.* The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, v. 32, n. 13, p. 3435–3446, maio 2011.

XU, Y. H. *et al.* Turnover and distribution of intravenously administered mannose-terminated human acid beta-glucosidase in murine and human tissues. *Pediatric research*, v. 39, n. 2, p. 313–22, fev. 1996.

ZHANG, S. *et al.* Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Advanced Materials*, v. 21, n. 4, p. 419–424, 26 jan. 2009.

ZHAO, J.; STENZEL, M. H. *Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. Polymer Chemistry*. [S.l.]: Royal Society of Chemistry. , 21 jan. 2018